

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA ŽURAN

**POVEZANOST POLIMORFIZMA 245T>G V GENU ZA OSTEOPROTEGERIN Z  
MINERALNO KOSTNO GOSTOTO IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE  
PREMENE**

**ASSOCIATION OF THE POLIMORPHISM 245T>G IN THE GEN FOR  
OSTEOPROTEGERIN WITH BONE MINERAL DENSITY AND  
BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TURNOVER.**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.. Meritve mineralne kostne gostote in biokemičnih kazalcev kostne premene so opravili na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje in v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor.

### **Zahvala**

Mentorici izr. prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem. se zahvaljujem, da se je pred enim letom odzvala na mojo željo po raziskovalnem delu in me s svojimi nasveti usmerjala.

Posebna zahvala gre tudi somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm., ki me je skrbno uvedla v laboratorijsko delo, mi pomagala pri vseh nastalih težavah in me usmerjala do točke, ko sem rezultate lahko ubesedila v diplomu.

Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo, da so me sprejeli medse in mi nudili pomoč.

Nazadnje pa hvala mojim domačim, katerih podpora mi je pomagala prestati težke trenutke.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm..

Ljubljana, september 2009

Tina Žuran

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

# KAZALO

<b>KAZALO</b>	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b>	<b>III</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>IV</b>
<b>SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIV</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>I</b>
<b>1.1 KOSTNINA</b>	<b>1</b>
1.1.1 Zgradba kostnine	1
1.1.2 Mikroskopska in makroskopska delitev kostnine	3
1.1.3 Kostna premena	3
1.1.4 Biokemični kazalci kostne premene	5
1.1.4.1 Biokemični kazalci tvorbe kostnine	6
1.1.4.2 Biokemični kazalci razgradnje kostnine	6
<b>1.2 OSTEOPOROZA</b>	<b>8</b>
1.2.1 Incidenca in prevalenca osteoporoze	8
1.2.2 Etiopatogeneza osteoporoze	9
1.2.3 Oblike osteoporoze	10
1.2.4 Diagnostika in spremljanje osteoporoze	10
1.2.5 Dejavniki tveganja	11
1.2.6 Genetski dejavniki pri osteoporozi	11
<b>1.3 OSTEOPROTEGERIN</b>	<b>12</b>
1.3.1 Delovanje OPG	13
1.3.2 Uravnavanje RANKL/RANK/OPG sistema	15
1.3.3 Zgradba proteina OPG	15
1.3.4 Zgradba gena za OPG	16
1.3.2.1 Znani polimorfizmi v genu za OPG in njihov klinični pomen	17
<b>2. NAMEN DELA</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>20</b>
<b>3.1 SPLOŠNA OPOZORILA</b>	<b>20</b>
<b>3.2 OPIS PREISKOVANCEV</b>	<b>20</b>
<b>3.3 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE</b>	<b>21</b>
<b>3.4 MERJENJE KONCENTRACIJ BIOKEMIČNIH KAZALCEV KOSTNE PREMENE</b>	<b>21</b>
<b>3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO</b>	<b>22</b>
3.5.1 Priprava reakcijske zmesi	23
3.5.2 Reakcijski pogoji	24
3.5.3 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije	24
3.5.3.1 Priprava agaroznega gela	25
3.5.3.2 Elektroforezna ločba	25
3.5.4 Materiali in oprema	26
3.5.4.1 PCR	26
3.5.4.2 Elektroforeza	26
<b>3.6 ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV</b>	<b>27</b>
3.6.1 Priprava reakcijske zmesi	28
3.6.2 Ločevanje produktov restrikcije z elektroforezo na agaroznem gelu	29
3.6.2.1 Priprava 4% agaroznega gela in postopek elektroforeze	29

3.6.2.2 Barvanje gela z Sybr Green I	29
3.6.3 <i>Materiali in oprema</i>	30
3.6.3.1 RFLP	30
3.6.3.2. Elektroforeza	30
3.6.3.3. Barvanje gela z Sybr Green I barvilom	31
<b>3.7 STATISTIČNE METODE</b>	<b>31</b>
3.7.1 <i>Hardy – Weinbergovo načelo</i>	31
3.7.2 <i>Kolmogorov – Smirnov test normalnosti porazdelitve</i>	32
3.7.3 <i>Statistična analiza razlik v parametrih med genotipskimi podskupinami</i>	32
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>33</b>
<b>4.1 OPTIMIZCIJA POGOJEV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO</b>	<b>33</b>
<b>4.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV ANALIZE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV</b>	<b>34</b>
<b>4.3 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA 245T&gt;G</b>	<b>35</b>
<b>4.4 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA 245T&gt;G V GENU ZA OPG Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE</b>	<b>37</b>
4.4.1 <i>Skupina moških</i>	39
4.4.2 <i>Skupina premenopavznih žensk</i>	40
4.4.3 <i>Skupina pomenopavznih žensk</i>	40
4.4.3.1 <i>Zdrave pomenopavzne ženske</i>	42
4.4.3.2 <i>Osteoporozne pomenopavzne ženske</i>	43
4.4.4 <i>Farmakogenetska analiza</i>	44
4.4.4.1 <i>Zdravljene z raloksifenom</i>	44
4.4.4.2 <i>Zdravljene z alendronatom</i>	45
<b>5. SKLEP</b>	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>49</b>
<b>PRILOGA 1</b>	<b>53</b>

## POVZETEK

Kostnina je tkivo, ki se neprestano obnavlja v procesu kostne premene. Kostna premena vključuje dva procesa: razgradnjo kostnine z osteoklasti in tvorbo kostnine z osteoblasti. Porušeno ravnotežje med tema dvema procesoma lahko vodi do različnih bolezni, na primer osteoporoze, za katero sta značilni znižana mineralna kostna gostota (MKG) in porušena mikroarhitektura kostnega tkiva ter posledično večje tveganje za zlom.

V kostni homeostazi ima pomembno vlogo osteoprotegerin (OPG), ki je topen sekretorni protein. OPG vpliva na kostno premeno in ščiti kost pred pretirano osteoklastno razgradnjo. Z vezavo OPG na RANKL se prepreči vezava na RANK in posledično prepreči diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Pomanjkanje OPG lahko povzroči nastanek osteoporoze. Zaradi opisane vloge OPG v kostni premeni je *OPG* gen kandidatni gen za raziskave genskih vplivov na MKG in tveganje za zlome pri ženskah in moških. Ker izražanje gena uravnava njegov promotor, lahko promotorske spremembe vplivajo na količino sintetiziranega proteina. V naši raziskavi smo zato iskali povezanost polimorfizma 245T>G v promotorju gena za OPG z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene, ki bi tako lahko postal pomemben genetski označevalec ali potencialna nova tarča za zdravljenje osteoporoze.

V raziskavo smo vključili 718 preiskovancev (117 moških in 601 žensko), ki smo jim izmerili MKG in biokemične kazalce kostne premene. Z reakcijo PCR smo pomnožili 271 bp dolg fragment začetnega dela promotorja gena za OPG, z analizo *HinfI*-RFLP pa smo vzorcem določili genotip.

Relativne frekvence genotipov, ki smo jih določili so naslednje: 87,6 % : 11,6 % : 0,7 % za genotipe TT : TG : GG. Polimorfizem 245T>G je bil pri moških povezan s koncentracijami OPG ( $p=0,008$ ), v skupini pomenopavznih žensk z MKG ledvenega predela hrbtenice ( $p=0,048$ ), v skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk pa z MKG vratu stegenice ( $p=0,029$ ) in ledvenega predela hrbtenice ( $p=0,007$ ). V skupinah zdravih pomenopavznih žensk, premenopavznih žensk, osteoporoznih pomenopavznih žensk zdravljenih z raloksifenom ali alendronatom nismo dokazali povezanosti polimorfizma 245T>G z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

---

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>ALT</b>	encim alanin-aminotransferaza
<b>AST</b>	encim aspartat-aminotransferaza
<b>BALP</b>	kostno specifična alkalna fosfataza
<b>bp</b>	bazni par
<b>Cbfa1</b>	osteoblast specifični transkripcijski faktor (ang. core binding factor a1)
<b>C-Fms</b>	receptor za M-CSF
<b>CTX</b>	C-terminalni telopeptid kolagena I
<b>D</b>	domena
<b>DDH</b>	smrtna domena
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>DPYR</b>	deoksipiridinolin
<b>ELISA</b>	encimsko imunski test na trdem nosilcu
<b>ETBr</b>	etidijev bromid
<b>fn</b>	vrat stegenice (ang. femoral neck)
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
<b>IL</b>	interlevkin
<b>INF</b>	interferon
<b>ITM</b>	indeks telesne mase
<b>ls</b>	predel ledvene hrbtenice (ang. lumbar spine)
<b>M-CSF</b>	makrofagne kolonije stimulirajoči faktor
<b>MKG</b>	mineralna kostna gostota
<b>NTX</b>	N-terminalni telopeptid kolagena I
<b>OC</b>	osteokalcin
<b>OPG</b>	osteoprotegerin
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>PGE</b>	prostaglandin
<b>PICP</b>	C-terminalni propeptid kolagena I
<b>PINP</b>	N-terminalni propeptid kolagena I
<b>PTH</b>	parathormon
<b>PYR</b>	piridinolin

<b>RANK</b>	receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B
<b>RANKL</b>	ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B
<b>RFLP</b>	analiza dolžin restrikcijskih fragmentov
<b>RIA</b>	radioimunski test
<b>TAE</b>	tris-acetat-EDTA
<b>TGF</b>	transformirajoči rastni faktor
<b>TNF</b>	dejavnik tumorske nekroze (ang. tumor necrosis factor)
<b>tot</b>	kolk (ang. total hip)
<b>TRAF</b>	z dejavnikom tumorske nekroze povezan faktor
<b>TRAP</b>	tartrat rezistentna kislina fosfataza
<b>TSH</b>	ščitnico stimulirajoči hormon

---

## SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

- Slika 1:** Zgradba kostnine.
- Slika 2:** Faze kostne premene.
- Slika 3:** Spremljanje MKG s starostjo.
- Slika 4:** RANKL/RANK/OPG sistema
- Slika 5:** Zgradba človeškega OPG.
- Slika 6:** Prikaz strukture gena za OPG.
- Slika 7:** Shematski prikaz PCR cikla.
- Slika 8:** Zaporedje, ki ga cepi restriksijski encim *HinfI*.
- Slika 9:** Rezultat uspešne elektroforeze PCR produktov desetih vzorcev na 2% agaroznem gelu z vgrajenim ETBr.
- Slika 10:** Cepitvena mesta 271 bp dolgega odseka promotorske regije gena za OPG za restriksijsko endonukleazo *HinfI*.
- Slika 11:** Rezultat analize RFLP na 4% agaroznem gelu.
- 

- Preglednica I:** Biokemični kazalci tvorbe kostnine in razgradnje kostnine.
- Preglednica II:** Dejavniki tveganja za osteoporozo.
- Preglednica III:** Najbolj proučevani kandidatni geni za osteoporozo.
- Preglednica IV:** Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNA.
- Preglednica V:** Reakcijski pogoji za pomnoževanje začetnega dela promotorja gena OPG
- Preglednica VI:** Sestava reakcijske zmesi za RFLP analizo za en vzorec.
- Preglednica VII:** Preglednica prikazuje dolžine fragmentov pri posameznem genotipu.
- Preglednica VIII:** Relativne frekvence (%) genotipov za preiskovani polimorfizem v posamezni skupini preiskovancev
- Preglednica IX:** Relativne frekvence posameznega genotipa pri Evropejcih, Azijcih in Afroameričanih.
- Preglednica X:** Klinične značilnosti preiskovance posamezne skupine
- Preglednica XI:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene pri moških ter rezultati statistične obdelave
- Preglednica XII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih



---

kazalcev kostne premene pri premenopavznih ženskah ter rezultati statistične obdelave

**Preglednica XIII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene pri pomenopavznih ženskah ter rezultati statistične obdelave

**Preglednica XIV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene pri zdravih pomenopavznih ženskah ter rezultati statistične obdelave

**Preglednica XV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah

**Preglednica XVI:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z raloksifenom

**Preglednica XVII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z alendronatom

# 1. UVOD

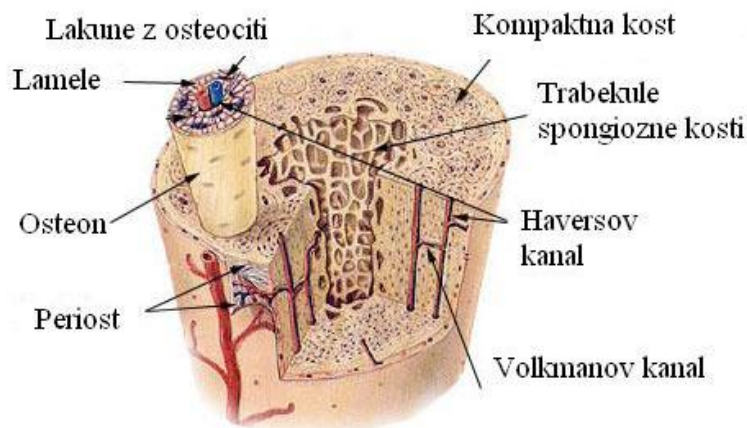
## 1.1 KOSTNINA

Človeški skelet je sestavljen iz 206 kosti, ki opravljajo različne funkcije. Kosti ščitijo vitalne organe, dajejo telesu oporo, služijo kot nasadišče za mišice in tako omogočajo funkcijo vzvoda. V kosteh je kostni mozeg, ki je krvotvorni organ. Kosti predstavljajo zalogo kalcijevih, fosfatnih, magnezijevih in drugih ionov. Značilno za kosti je, da so dobro prekrvavljene, trdne in prožne, ter se po prelomu praviloma popolnoma obnovijo (4).

### *1.1.1 Zgradba kostnine*

Kostnina je živa snov. Sestavljena je iz celic, medceličnine ter vezivne ovojnice. Vezivo, ki na zunanji in notranji površini obdaja kostnino je dobro ožiljeno. Imenujemo ga pokostnica. Pokostnica na zunanji površini se imenuje periost, na notranji strani pa endost. Naloga pokostnice je preskrba kostnine s hranilnimi snovmi in z novimi osteoblasti (1).

Kostna medceličnina je sestavljena iz organskih in anorganskih sestavin. Anorganski del, ki predstavlja kar 65 % kostne mase, je sestavljen predvsem iz kalcijevih in fosfatnih spojin. Kalcij v amorfnem kalcijevem fosfatu se neprestano izmenjuje s kalcijevimi ioni v telesnih tekočinah. Kalcij vezan v kristalih kalcijevega hidroksiapatita pa se nalaga na osnovo iz organske medceličnine. Organski del kostne medceličnine je sestavljen iz različnih beljakovin, od katerih je največ kolagena tipa I (90 %). Pri odraslem človeku so kolagenska vlakna razporejena tako, da tvorijo lamele. Lamelle so urejene koncentrično okoli centralno potekajočega Haversovega kanala. Med lamelami ležijo osteociti v lakunah. V Haversovem kanalu so krvne žile in živci. Skupaj tvorijo osnovno gradbeno enoto kostnine: osteon. Haversove kanale med seboj povezujejo Volkmanovi kanali (2).



Slika 1: Zgradba kostnine.

Kostnino sestavljajo tri vrste kostnih celic: osteoblasti, osteociti in osteoklasti (1).

- **Osteoblasti** so enojedrne celice in so odgovorni za tvorbo kosti. Nastanejo iz osteoprogenitornih celic. Tvorijo organski del kostnine ter nekatere lokalne faktorje, s katerimi vplivajo na tvorbo in delovanje osteoklastov. Aktivni osteoblasti imajo v citoplazmi veliko endoplazmatskega retikuluma (ER), ki sintetizira beljakovine in druge sestavine kostnega matriksa. Aktivni osteoblasti vsebujejo večje količine alkalne fosfataze, občutljivi so na hormone in lokalne dejavnike. Neaktivni osteoblasti imajo v citoplazmi malo organelov. Občutljivi so le na nekatere hormone in ne morejo tvoriti beljakovin kostnega matriksa. Prekrivajo mirujočo kostno površino.
- **Osteociti** so preoblikovani osteoblasti. Ujeti so v že oblikovano medceličnino kosti. Med seboj in s površino kostnine so povezani s posebnimi kanalčki. Osteociti imajo poleg lastnosti osteoblastov še sposobnost razgradnje kosti in tako omogočajo hitro preskrbo s kalcijem ter uravnoteženost notranjega okolja.
- **Osteoklasti** so velike mnogojedrne celice ki razgrajujejo kostnino. Izvirajo iz hematopoetičnih celic makrofagno-monocitne vrste. Osteoklasti imajo v citoplazmi številne lizosome in mitohondrije zaradi katerih imajo izredno acidofilno citoplazmo. Ne mestu razgradnje kosti se membrana osteoklasta močno naguba in s tem poveča resorpcijsko površino. Predeli izdolbene kostnine se imenujejo Howshipove lakune (2,3).

### ***1.1.2 Mikroskopska in makroskopska delitev kostnine***

Mikroskopsko ločimo primarno ali prepleteno kostnino in sekundarno ali lamelarno kostnino. Prepleteno kostnino najdemo pri zarodku ali pa nastane po zlomu kosti. Zanj je značilno, da se kolagenska vlakna prepletajo neurejeno. Iz prepletene kostnine nastane lamelarna kostnina. V lamelarni kostnini so kolagenska vlakna urejena v lamele (1).

Makroskopsko ločimo kompaktno ali kortikalno kostnino in spongiozno ali trabekularno kostnino. Dolga kost ima dva končna dela (epifiza) in srednji del (diafiza). Epifiza je zgrajena iz spongiozne kostnine, ki jo pokriva tanka plast kompaktne kostnine. Diafiza je skoraj v celoti zgrajena iz kompaktne kostnine. Spongioza je urejena v trabekule, ki potekajo v smeri največje obremenitve kosti. Velik delež spongiozne kostnine vsebujejo hrbtenična vretenca, proksimalni del stegenice in zapestja, ki predstavljajo glavno zalogo kalcija (4).

### ***1.1.3 Kostna premena***

Kostna premena vključuje dva procesa, ki sta usklajena: proces razgradnje kostnine in proces tvorbe kostnine. Je stalen proces, ki poteka vse življenje (5). Proces stalnega obnavljanja kosti je odvisen od številnih notranjih (genetskih, hormonskih, lokalnih) in mehanskih dejavnikov. Razgradnja in tvorba kostnine sta med seboj povezani na tri načine:

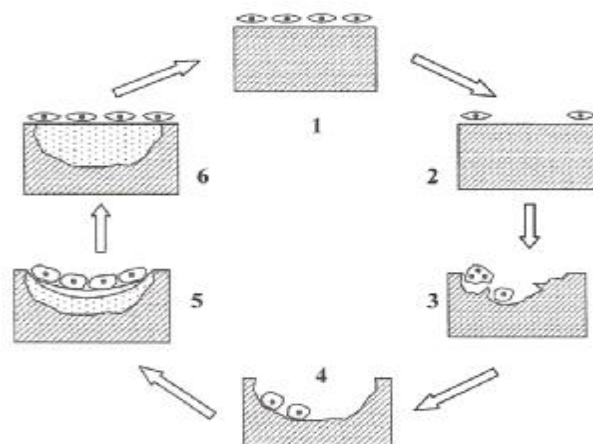
- oba procesa se pojavljata v točno določenem zaporedju;
- v procesu premene ostaja kvaliteta kosti enaka;
- količina kosti ostaja enaka, torej se lakune popolnoma zapolnijo z novo kostnino (3).

Proces tvorbe kostnine traja približno tri mesece, med tem ko razgradnja kostnine traja le nekaj dni. Domnevno se v 4 mesece trajajočem ciklusu kostne premene zamenja približno  $10,6 \text{ mm}^3$  kostnine (6).

Proces kostne premene zajema več faz (Slika 2):

- **Mirujoča faza:** Večina kostnine je v mirujoči fazi. Kostnino pokrivajo sploščeni, mirujoči osteoblasti.
- **Faza razgaljenja:** Razmakne se tanka plast mirujočih osteoblastov.

- **Faza aktivacije:** Kemične snovi, ki jih vsebuje razgaljena kostnina privabijo osteoklaste.
- **Faza razgradnje kostnine:** Osteoklasti razgradijo kostnino s sproščanjem mlečne in hialuronske kisline ter proteolitičnih encimov. Nastane Howshipova lakuna. Nato se proces razgradnje ustavi.
- **Faza preobrata:** Na mesto izdolbene lakune pridejo enojedrni fagociti, ki počistijo nastalo votlino, jo zgladijo in v njej naložijo cementno plast. Ta faza opisuje čas, ki poteče od razgradnje kostnine do pričetka tvorbe nove kostnine.
- **Faza tvorbe osteoida:** Nekateri beljakovine organskega matriksa in lokalni rastni faktorji povzročijo nastajanje zrelih osteoblastov iz osteoprogenitornih celic. Zreli osteoblasti tvorijo osteoid, ki je sestavljen iz lamelarno razvrščenega kolagena. Osteoblasti na novonastalem osteoidu se lahko preoblikujejo v tanke mirujoče osteoblaste, tisti, ki so ujeti med novonastali osteoid, pa v osteocite.
- **Faza mineralizacije:** V fazi mineralizacije imajo pomembno vlogo predvsem alkalna fosfataza, ki jo izločajo aktivni osteoblasti, osteokalcin in osteonektin ter koncentracija kalcijevih in fosfatnih ionov. Struktura kolagena v osteoidu je takšna, da ima med molekulami dovolj velike prostore, da se mednje lahko naložijo kristali hidroksiapatita.
- **Mirujoča faza:** po končani mineralizaciji mirujoči osteoblasti prekrijejo novo nastalo kostnino (3,5).



**Slika 2:** Faze kostne premene. 1- mirujoča faza, 2- faza razgaljenja in aktivacije osteoklastov, 3- faza razgradnje, 4- faza preobrata, 5- faza nastanka osteoida in mineralizacije, 6- mirujoča faza po obnovi kosti.

Za usklajenost med razgradnjo kosti in tvorbo kosti je potrebna komunikacija med kostnimi celicami. Komunikacija poteka s pomočjo različnih molekul, predvsem citokinov (7).

#### 1.1.4 Biokemični kazalci kostne premene

Biokemični kazalci kostne premene so snovi, ki nastajajo v procesu kostne premene in odražajo intenzivnost tega procesa. Razvoj metod določanja biokemičnih kazalcev, ki specifično odražajo stopnjo tvorbe kostnine ali razgradnje kostnine, je povečal spekter analiz, ki se uporabljajo pri ocenjevanju patogeneze skeleta. To so neinvazivne in poceni metode, ki so ob pravilni uporabi in interpretaciji zelo uporabne pri diagnosticiranju in terapiji presnovnih bolezni kosti, predvsem pri boleznih, kjer sta razgradnja ali tvorba kostnine spremenjena. Biokemične kazalce kostne premene delimo v dve skupini: biokemični kazalci tvorbe kostnine in biokemični kazalci razgradnje kostnine (Preglednica I) (9, 32).

**Preglednica I:** Biokemični kazalci tvorbe kostnine in razgradnje kostnine.

<b>BIOKEMIČNI KAZALCI TVORBE KOSTNINE</b>	<b>BIOKEMIČNI KAZALCI RAZGRADNJE KOSTNINE</b>
Kostno specifična alkalna fosfataza	Tartrat rezistentna kislja fosfataza
Osteokalcin	Presnovki kolagen tipa I
Propeptidi kolagen tipa I: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prokolagen IC-terminalni propeptid</li> <li>• Prokolagen I N-terminalni propeptid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroksiprolin</li> <li>• Piridinolin in deoksipiridinolin</li> <li>• Karboksi- in aminotelopektidi</li> </ul>
	Katepsin K
	RANKL
	OPG

Pri počasi potekajočih procesih, kot je osteoporoz, so biokemični kazalci pogosto v mejah normalnih vrednosti in so v diagnostiki zato manj pomembni. Določamo jih predvsem pri zapletenih oblikah osteoporoze in med zdravljenjem, kadar želimo preveriti učinek zdravila (3, 33).

### 1.1.4.1 Biokemični kazalci tvorbe kostnine

#### *Kostno specifična alkalna fosfataza*

V serumu je alkalna fosfataza (ALP) vsota aktivnosti njenih različnih izoencimov. Polovico aktivnosti predstavlja jetrni izoencim. V patoloških stanjih se v organizmu tvorijo tudi drugi izoencimi ALP. Aktivnost celotne ALP ni specifičen biokemični kazalec kostne premene. Specifičnost dosežemo, če določimo le kostno specifično ALP (BALP, ang. bone alkaline phosphatase). Kostno specifični izoencim ločimo z imunokemijskimi metodami z vezavo na monoklonska protitelesa, specifična proti BALP. Ostale izoencime odstranimo z spiranjem. Aktivnost BALP določimo spektrofotometrično. Izvedemo barvno reakcijo, pri kateri BALP cepi p-nitrofenilfosfat do rumeno obarvanega produkta (p-nitrofenol). Količino nastalega barvnega produkta določimo z absorbanco, ki je sorazmerna z aktivnostjo BALP.

#### *Osteokalcin*

Osteokalcin (OC) je nekolageni protein, ki ga sintetizirajo osteoblasti pod vplivom vezave receptorja za vitamin D. Z vezavo kalcijevih ionov omogoča mineralizacijo kostnega tkiva. Vezava je odvisna od vitamina K. Koncentracija osteokalcina v plazmi je sorazmerna aktivnosti osteokalcina v kosteh in sorazmerna intenziteti sinteze kolagena. Osteokalcin izmerimo z kemiluminiscenčnim encimskoimunokemijskim testom v plazmi po dodatku heparina.

#### *Propeptidi kolagena tipa I*

N-terminalni propeptid in C-terminalni propeptid kolagena I (PINP in PICP) v serumu odražata intenziteto sinteze kolagena in posledično intenziteto tvorbe kostnine. Določamo ju imunokemično z ELISA ali RIA testom (34).

### 1.4.2 Biokemični kazalci razgradnje kostnine

#### *Tartrat rezistentna kislina fosfataza*

Tartrat rezistentna kislina fosfataza (TRAP) je lizosomalni encim, ki deluje v močnem kislem območju. Osteoklasti izločajo izoencim TRAP5b, ki razgrajuje minerale v kostnini, omogoča nastanek resorpcijske lakune in je tako edini kazalec aktivnosti osteoklastov.

Koncentracija TRAP5b v serumu je sorazmerna z aktivnostjo osteoklastov. Njena koncentracija je povišana ob povečani aktivnosti osteoklastov in povečani razgradnji kostnine. TRAP določamo imunokemijsko, lahko pa tudi z elektroforezo (7, 8, 34).

#### *Hidroksiprolin*

Hidroksiprolin je aminokislina v kolagenu, vendar je zastopan v različnih tipih kolagena in je zato nespecifičen kazalec kostne premene ter se v praksi ne uporablja. Določamo ga v urinu z HPLC.

#### *Piridinolin in deosipiridinolin*

Trdnost kolagenske strukture je določena z številom prečnih povezav, ki jih tvorita piridinolin (PYR) in deoksipiridinolin (DPYR). Ob razgradnji kolagena se sproščata v urin in krvni obtok in tako odražata intenziteto razgradnje kolagena. Včasih so v urinu in serumu določali PYR in DYPR z HPLC, danes se uporabljajo imunokemijske metode, ki so hitrejše in bolj natančne.

#### *C-terminalni in N-terminalni telopeptid*

C-terminalni in N-terminalni telopeptid (CTX in NTX) sta telopeptida kolagena tipa 1, ki imata še vezane prečne povezovalce. Sta najboljša biokemijska kazalca razgradnje kostnine, ki sta trenutno v uporabi. Določamo ju v serumu ali urinu z imunokemičnimi testi ELISA ali RIA ter elektrokemiluminiscenco (34).

#### *Katepsin K*

Katepsin K je lizosomalni encim, ki sodeluje v razgradnji kostnine. Njegova koncentracija v serumu naraste ob povečani razgradnji kostnine in je tako sorazmerna z aktivnostjo osteoklastov. Koncentracijo v serumu določimo imunokemijsko, z ELISA testom (35).

#### *Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika $\kappa$ B*

Ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand- RANKL) nastaja v osteoblastih in z vezavo na RANK (receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B; angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B) povzroči diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Povišane vrednosti RANKL ob hkratnih znižanih



vrednostnih OPG kažejo na povečano osteoklastogenezo. RANKL določamo v serumu ali plazmi z encimsko-immunskim testom sendvič ELISA (36).

### *Osteoprotegerin*

Osteoprotegerin (OPG) z vezavo na RANKL prepreči vezavo le tega na RANK in posledično prepreči aktivacijo in diferenciacijo osteoklastov. Znižane vrednosti OPG kažejo na povečano osteoklastogenezo. OPG določamo v plazmi ali serumu z encimsko-immunskim testom sendvič ELISA. Spremljanje vrednosti OPG ima pomembno vlogo pri ocenjevanju učinkovitosti zdravljenja osteoporoze (36).

## **1.2 OSTEOPOROZA**

Osteoporoza je sistemska skeletna bolezen, za katero je značilna nizka mineralna kostna gostota (MKG) in spremembe v mikroarhitekturi kostnega tkiva, ter posledično povečana lomljivost kosti. Svetovna zdravstvena organizacija opredeljuje osteoporozo na osnovi merjenja MKG, kot znižanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase. Osteopenija je opredeljena kot MKG med 1 in 2,5 SD. O hudi osteoporozi pa govorimo, kadar vrednost MKG preseže 2,5 SD in je prisoten en ali več zlomov (5).

### ***1.2.1 Incidenca in prevalenca osteoporoze***

Osteoporoza je najpogostejša presnovna bolezen kosti. Osteopenijo naj bi imelo približno 15 % mladih odraslih ljudi, približno 0,6 % pa osteoporozo. Z napredujočim zmanjševanjem MKG, ki spremlja staranje, se povečuje delež prebivalstva z osteoporozo in spremljajočimi zlomi (10). Do 80. leta starosti naj bi tako imela osteoporozo vsaka tretja ženska in vsak šesti moški. Značilni osteoporotični zlomi so zlom zapestja, vretenc in kolka. Po 75. letu starosti njihovo število strmo narašča. Pričakovana življenjska doba je pri osebah, ki so utrpeli osteoporotični zlom kolka ali vretenca, krajša. Smrtnost po zlomu kolka je 10 – 20 % (2). Če primerjamo ista starostna obdobja, je pri ženskah vsaj enkrat več zlomov kot pri moških. Vzrok je deloma daljša življenjska doba žensk, deloma pa je to

posledica večje telesne mase, večjih kosti in odsotnosti naglega zmanjšanja endogenih spolnih hormonov pri moških (10).

Leta 2006 so zaključili prvo prevalenčno raziskavo o osteoporozi v Sloveniji. V raziskavo so vključili 509 preiskovancev. V celotni skupini preiskovancev je imelo 43 % preiskovancev osteopenijo in 23 % preiskovancev osteoporozo. Prevalenca osteoporoze pri ženskah starih nad 50 let je bila 27,5 %, prevalenca osteoporoze pri moških nad 60. letom pa 14,6 %. Delež osteoporoznih bolnic pri ženskah starih nad 65 let je bil 40,6 %, pri moških iste starostne skupine pa 16,7 %, kar kaže na porast deleža osteoporoze s starostjo. Le majhen delež preiskovancev (24,9 %) pri katerih so določili osteoporozo je imelo že postavljeno diagnozo in so se zdravili (49).

### 1.2.2 Etiopatogeneza osteoporoze

V obdobju rasti se povečuje velikost skeleta in količina MKG. Do 30. leta starosti dosežemo največjo MKG, ki je odvisna predvsem od genetske zasnove. Med 30. in 40. letom starosti so procesi tvorbe in razgradnje kosti uravnoteženi. Po 40. letu starosti se začne fiziološko manjšanje MKG pri obeh spolih in traja do konca življenja. Po menopavzi, ko je količina estrogenov izrazito manjša, je hitrost izgubljanja MKG pri ženskah mnogo večja kot pri moških (Slika 3) (2).



Slika 3: Spremljanje MKG s starostjo.

### ***1.2.3 Oblike osteoporozе***

Osteoporozo delimo na primarno in sekundarno osteoporozo. Primarno osteoporozo delimo na štiri tipe: pomenopavzalna, senilna, juvenilna in nosečnostna osteoporozа. Pomenopavzalna osteoporozа nastane pri ženskah med 50. in 70. letom starosti. Zanjо je značilno izgubljanje predvsem trabekularne kosti. Senilna osteoporozа nastane pri ženskah po 70. letu starosti, prizadene pa tudi moške. Vzrok je zmanjšana absorpcija kalcija iz črevesja. Juvenilna osteoporozа se pojavi v dobi odraščanja in je redka bolezen. Po 2 do 4 letih spontano izgine. Vzrok bolezni ni znan. Nosečnostna osteoporozа se manifestira s kompresijskimi zlomi vretenc. Po porodu prične MKG spontano naraščati. Sekundarno osteoporozo povzročajo različne bolezni ter nekatera zdravila (2, 12).

### ***1.2.4 Diagnostika in spremljanje osteoporozе***

Osteoporozа je bolezen, ki v odsotnosti zlomov nima nobenih drugih simptomov. Za odkrivanje osteoporozе obstaja več metod rentgenske kot tudi laboratorijske diagnostike:

- **Dvoenergijska rentgenska absorpciometrija** (DXA, *angl. Dual-energy X-ray absorptiometry*) je najpogostejša metoda za merjenje MKG, ki je edini zanesljivi način za diagnosticiranje osteoporozе in določanje tveganja za zlom kosti.
- **Ultrazvočna preiskava petnice** se uporablja kot presejalna metoda za osteoporozo.
- **Rentgensko slikanje** hrbtenice lahko uporabimo za diagnosticiranje napredovale osteoporozе, vendar šele, ko je MKG zmanjšana za več kot 30 %.
- **Merjenje koncentracije biokemičnih kazalcev kostne premene** določamo predvsem pred začetkom zdravljenja zapletenih oblik osteoporozе in za spremljanje učinkovitosti predpisanega zdravila.
- **Druge klinične in laboratorijske preiskave** izvedemo, da izključimo druge bolezni, ki jih osteoporozа lahko spremlja, ali ugotovimo prisotnost sekundarne osteoporozе (2,7).

### 1.2.5 Dejavniki tveganja

Dejavniki tveganja nakazujejo verjetnost razvoja končnega stanja bolezni v prihodnosti. Ker se pojavijo pred boleznijo jih lahko uporabljamo za oceno tveganja nastanka bolezni oziroma zlomov (Preglednica II) (2,10).

**Preglednica II:** Dejavniki tveganja za osteoporozo.

ENDOGENI DEJAVNIKI TVEGANJA	EKSOGENI DEJAVNIKI TVEGANJA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bela ali azijska rasa</li> <li>• Ženski spol</li> <li>• Zlomi kosti ob manjših poškodbah pri ožjih sorodnikih</li> <li>• Zgodnja menopavza (naravna ali zaradi odstranitve jajčnikov)</li> <li>• Zapozneta puberteta</li> <li>• Drobnost konstitucija</li> <li>• Bolezni prebavil, žlez z notranjim izločanjem, kronična bolezen ledvic, jeter, presaditev organov</li> <li>• Genetski dejavniki</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telesna neaktivnost</li> <li>• Malo kalcija in beljakovin v prehrani</li> <li>• Nezadostna izpostavljenost soncu</li> <li>• Prekomerno pitje alkohola</li> <li>• Kajenje</li> <li>• Prekomerno uživanje kave</li> <li>• Dolgotrajno jemanje nekaterih zdravil (glukokortikoidi, heparin, antiepileptiki,...)</li> </ul>

### 1.2.6 Genetski dejavniki pri osteoporozi

Študije na dvojčkih so pokazale, da imajo genetski dejavniki pomembno vlogo pri uravnavanju MKG, ter tudi pri uravnavanju kostne premene, kvaliteti kostnine in drugih fenotipskih lastnosti pri osteoporozi. Osteoporozo je večfaktorna in poligenetska bolezen. Fenotip posameznika je odvisen od medsebojnega vpliva genov in okolja (12,14).

Na razvoj osteoporoze vplivajo številni geni, od katerih pa ima posamezen gen na kostno maso le majhen vpliv. Do danes so bili proučeni številni polimorfizmi v genskih zapisih proteinov, ki sodelujejo pri kostni premeni. Zaradi kompleksnosti osteoporoze pa še niso uspeli identificirati genov, ki bi bili povezani z razvojem osteoporoze (13). Eden prvih raziskanih genov v povezavi z osteoporozo je gen za vitamin D receptor. Do danes se je temu pridružilo že mnogo kandidatnih genov, ki naj bi bili povezani z MKG (Preglednica III) (12).

**Preglednica III:** Najpogosteje proučevani kandidatni geni za osteoporozo.

SKUPINA	KANDIDATEN GEN
KALCIOTROPNI HORMONI IN RECEPTORJI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Receptor za vitamin D</li> <li>• Estrogenski receptor</li> <li>• Receptor za kalcitonin</li> <li>• Kalcitonin</li> <li>• Paratiroidni hormon</li> <li>• Glukokortikoidni receptor</li> <li>• Androgenski receptor</li> </ul>
KOMPONENTE KOSTNEGA MATRIKSA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolagen tipa I <math>\alpha</math>I</li> <li>• Kolagen tipa I <math>\alpha</math>I</li> <li>• Osteokalcin</li> <li>• Osteonektin</li> <li>• Osteopontin</li> </ul>
LOKALNI REGULATORJI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TGF-<math>\beta</math>1</li> <li>• IGF-1</li> <li>• IL-1</li> <li>• IL-6</li> <li>• RANKL/RANK/OPG sistem</li> </ul>
DRUGO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolagenaza</li> <li>• Vitamin D vezujoči protein</li> </ul>

V prihodnosti bo znanje o genih, ki pozitivno ali negativno vplivajo na kostnino omogočalo odkrivanje posameznikov z večjim tveganjem za razvoj osteoporoze, individualni pristop pri zdravljenju in možnost načrtovanja novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje (14).

### 1.3 OSTEOPROTEGERIN

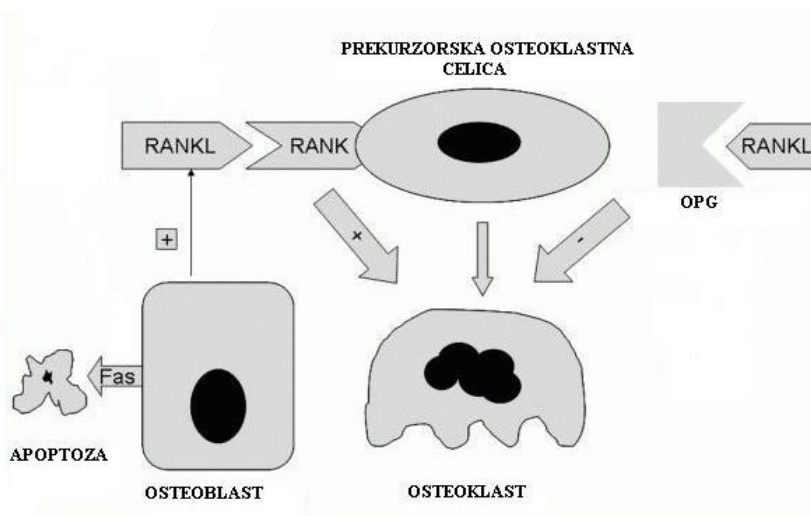
Osteoprotegerin (OPG) sta leta 1997 odkrili dve neodvisno delujoči skupini in ga uvrstili v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (angl. tumor necrosis factor receptor-TNFR). Njegova lastnost je zaščititi kost, po kateri je dobil ime (latin. *Os*, kost; *protegere*, zaščititi). Tudi druge skupine so neodvisno poročale o OPG, zato zanj obstaja več sinonimov: OCIF (angl. osteoclastogenesis inhibitory factor), TNFRSF11B (angl.

tumor necrosis factor receptor member 11B), TR1 (angl. TNFR-related molecule-1), FDCR-1 (angl. follicular dendritic cell receptor-1) (17,18).

### 1.3.1 Delovanje OPG

Sinteza OPG poteka v različnih tkivih. Poleg kostnega tkiva najdemo OPG-mRNA še v pljučih, srcu, ledvicah, jetrih, možganih, želodcu, črevesju in v manjših količinah tudi v ščitnici in placenti. Glavna biološka funkcija OPG v kosteh je inhibicija diferenciacije in aktivacije osteoklastov (24).

V procesu nastanka osteoklastov sodelujejo ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand- RANKL), receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B (angl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B – RANK) in OPG. Skupaj tvorijo sistem lokalnih dejavnikov RANKL/RANK/OPG, ki uravnava kostno premeno in je povezan z razvojem pomenopavzne osteoporoze, revmatoidnim artritisom, Pagetovo boleznijo in malignimi ter benignimi novotvorbami kosti. Sistem RANKL/RANK/OPG je najbolj raziskan v kosteh (slika 4) (17).



Slika 4: RANKL/RANK/OPG sistem

Celice osteoblastne vrste so odgovorne za izražanje membransko vezane in topne oblike RANKL ter tudi OPG (17). Za razvoj osteoklastov je potrebna interakcija med preosteoklasti in osteoblasti. RANKL, transmembrani ligand, ki se izraža na osteoblastih, ali prisoten v topni obliki, se veže na RANK (transmembrani receptor na hemopoetičnih osteoklastnih matičnih celicah, kot tudi na zrelih osteoklastih). Vezava liganda na receptor povzroči interakcijo RANK citoplazemske domene s TRAF (z dejavnikom tumorske nekroze povezani faktor). Obstaja 6 proteinov TRAF, med katerimi je najpomembnejši TRAF6. Aktivacija TRAF6 sproži prenos signala po treh signalnih poteh:

- Aktivacija c-jun N-terminalne kinaze (JNK)/c-fos/c-jun poti
- Aktivacija NF- $\kappa$ B transkripcijskega faktorja
- Preko vezave c-SRC kinaze aktivacija serin/treonin kinaze Akt/PKB(protein kinaze B)

Prvi dve poti sta odgovorni za diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov, tretja pot pa za protiapoptozne učinke (18). Z vezavo RANKL na njegov receptor RANK se torej aktivira vrsta osteoklastnih celičnih funkcij. RANKL je nujen citokin za diferenciacijo v procesu osteoklastogeneze, stimulacijo preživetja in fuzije prekursorov osteoklastnih celic in aktivacijo zrelih osteoklastov ter upočasnitev njihove apoptoze. OPG kot nemembranski receptor kompetitivno veže RANKL in nevtralizira vse njegove biološke vplive (19, 25). OPG z vezavo na RANKL prepreči njegovo vezavo na RANK, s tem inhibira osteoklastogenezo, z direktno vezavo na nekatere osteoklastne receptorje pa lahko direktno prepreči aktivacijo osteoklastov in inducira njihovo apoptozo (17, 25).

RANKL in OPG imata nasprotna učinka na kostno tkivo. Medtem ko RANKL deluje v smeri povečanja kostne razgradnje in zmanjšanja kostne mase, deluje OPG v smeri zmanjšanja razgradnje kosti in povečanja kostne mase (17).

Yano s sodelavci je ugotovil, da OPG v serumu narašča s starostjo pri moških in ženskah. Pri pomenopavznih ženskah so bile vrednosti OPG v serumu celo višje kot pri zdravih ženskah. Zato je bil OPG predlagan kot posredni pokazatelj povečane razgradnje kosti z leti ali po menopavzi (23).

### ***1.3.2 Uravnavanje RANKL/RANK/OPG sistema***

Kostna presnova je v veliki meri odvisna od razmerja koncentracij OPG in RANKL, ki sta nadzorovani preko mnogih osteotropnih hormonov in citokinov.

Hormoni (PTH, vitamin D in glukokortikoidi), mezenhimski transkripcijski faktorji (cbfa-1, PPAR-gama) in citokini (IL-11, prostaglandin E2-PGE<sub>2</sub>, bazični FGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-17, TNF $\alpha$ ) stimulirajo kostno razgradnjo z znižanjem sinteze OPG in stimulacijo sinteze RANKL. TGF- $\beta$  in estrogen preprečujeta kostno razgradnjo z zvišanjem sinteze OPG. Poskusi na miših so pokazali, da lahko povečanje OPG vpliva na hipokalcemične učinke in lahko prepreči stimulacijo kostne razgradnje zaradi paratiroidnega hormona, vitamina D, IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  (25).

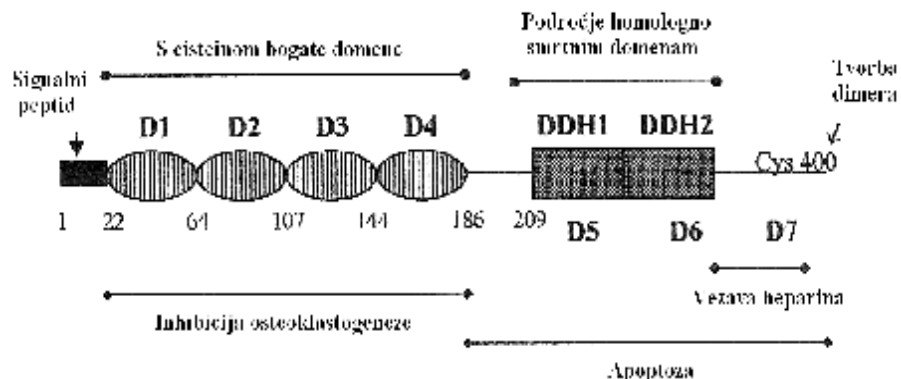
### ***1.3.3 Zgradba proteina OPG***

OPG je sekretorni protein, sestavljen iz 401 aminokislina s štirimi s cisteinom bogatimi psevdoponovitvami. Vsebuje 21 aminokislinski dolgi signalni peptid, ki je potreben za homodimerizacijo proteina preko disulfidne vezi na mestu 400 (18). V celicah (osteoblastih), kjer se sintetizira kot monomer z molekularno maso 55-62 kDa, prihaja do kovalentne vezave preko disulfidnih vezi v homodimer. Nato poteče še N-glikozilacija proteina, ki se izloča v ekstracelularni prostor. Homodimerni glikoprotein ima molekularno maso 120 kDa s 4-5 potencialnimi glikozilacijskimi mesti (16). V primerjavi z ostalimi predstavniki TNFR OPG nima transmembranske in citoplazemske domene (17).

Proteinsko molekulo OPG razdelimo na sedem strukturnih domen (slika 5):

- **D1** do **D4** so cisteinsko bogate domene z značilnostmi ekstracelularnih domen proteinov TNFR družine in tvorijo aktivno mesto proteina.
- **D5** in **D6** imata skupne strukturne značilnosti s »smrtnimi domenami« (DDH) drugih TNFR proteinov. »Smrtni domeni« posredujejo signale za celično smrt (apoptozo).
- **D7** zajema zadnjih 50 AK na C-terminalnem koncu. Vsebuje osem bazičnih (Lys, Arg) in le eno kislo AK (Glu), zato ima pozitiven neto naboj in predstavlja vezavno mesto za heparin (20).



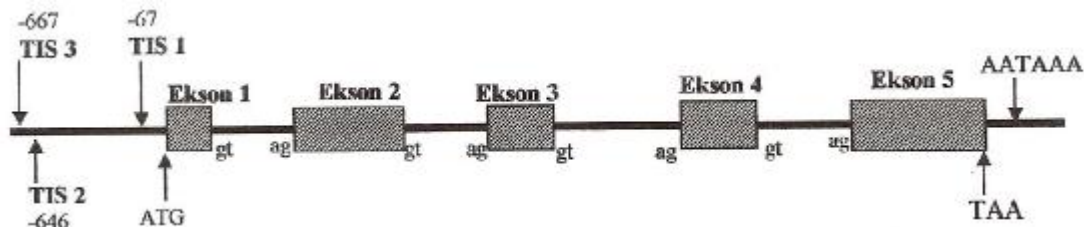


Slika 5: Zgradba človeškega OPG.

### 1.3.4 Zgradba gena za OPG

Gen za OPG so identificirali in klonirali leta 1998. Nahaja se na kromosomu 8q23-24 in je sestavljen iz petih eksonov, ki so razporejeni preko 29 kb človeškega genoma (21). Ekson 1 kodira 10 AK signalnega peptida, ekson 2 kodira prvi dve s cisteinom bogati domeni in večino tretje, ekson 3 kodira ostanek tretje in četrto s cisteinom bogato domeno. Ekson 4 kodira prvo in večino druge DDH, ekson 5 pa ostanek druge DDH in zajema translacijsko-terminacijski kodon. Eksoni so med seboj ločeni z introni (nekodirajoče regije). V promotorski regiji obstajajo tri različna mesta transkripcije (TIS). TIS 1 je glavno mesto začetka transkripcije, TIS 2 in TIS 3 pa alternativni (slika 6).

Po transkripciji se introni v procesu izrezovanja odstranijo in nastane informacijska OPG-mRNA. V glavnem nastane 2,2-3,0 kb dolga OPG-mRNA, obstajata pa še dve dolžini OPG-mRNA (4,2- 4,4 kb in 6,5-6,6 kb), ki nastajata v majhnih količinah. Vloga teh dveh dolžin mRNA pri regulaciji osteoklastogeneze še ni pojasnjena (16).



Slika 6: Prikaz strukture gena za OPG.

### 1.3.2.1 Znani polimorfizmi v genu za OPG in njihov klinični pomen

OPG ima pomembno vlogo pri uravnavanju kostne razgradnje in je zato eden od kandidatnih genov pri razvoju osteoporoz. Raziskave so bile izvedene na promotorju, vseh petih eksonih in intronih gena *OPG*. Do danes je že odkritih več kot 330 polimorfizmov v genu za OPG, od katerih je le nekaj klinično pomembnih (37). Mnogi raziskovalci so se lotili raziskav, v katerih so poskušali poiskati povezanost izbranih polimorfizmov z MKG in pojasniti vpliv le-teh na razvoj osteoporoz.

Langdahlova s sodelavci je v svoji raziskavi odkrila in klinično ovrednotila 12 polimorfizmov v genu za OPG in polimorfizma 163A>G in 245T>G uspela povezati z zvišanim tveganjem za zlome (23). V kasnejših raziskavah na večjih skupinah preiskovank povezanosti polimorfizma 163T>A z MKG niso dokazali (38, 39, 44, 45).

Arko s sodelavci je odkrila iste polimorfizme kot Langdahlova in še dodatnega trinajstega (889C>T). Povezavo z MKG so pokazali pri polimorfizmih 245T>G in 209G>A (22). Tako raziskava Langdahlove kot Arkove je odprla pot nadaljnjim raziskavam omenjenih polimorfizmov na večjem številu preiskovancev. V kasnejši raziskavi je Arko s sodelavci ovrednotila tudi vpliv polimorfizmov 1284G>C in 8738T>A (41).

Povezanost polimorfizma 245T>G in 209T>C z MKG je prav tako raziskoval Yamada s sodelavci pri japonskih ženskah in povezave z MKG ni odkril (46). Tudi drugi raziskovalci niso določili povezanosti teh dveh polimorfizmov z MKG (38, 40, 45).

Zelo pogosto proučevani polimorfizem v genu *OPG* je 1181G>C, ki so ga mnogi raziskovalci uspeli povezati z MKG (38, 39, 41, 42, 44), mnogi pa povezave niso dokazali (23, 40, 43, 45). Za polimorfizme 950T>C, 6890A>C, 1217G>C, 1284G>C, 4501C>T, 6893A>G, 6950A>C, 8738T>A raziskovalci niso uspeli določiti povezanosti z MKG (22, 23, 40, 41, 43, 45, 46).

Pred nedavnim sta bili izvedeni tudi dve vsegenomski raziskavi v zvezi z osteoporozo. V raziskavah so določevali polimorfizme v celotnem genomu preiskovancev in jih poskušali povezati z MKG. V Islandiji so raziskovali genom islandske, avstralske in danske populacije. Iz določenih polimorfizmov genoma so za 74 izbranih poskušali določiti povezanost z MKG. Povezanost z MKG so določili za polimorfizme na petih odsekih genoma, med katerimi je tudi gen za OPG (47). Podobno raziskavo so izvedli v Veliki Britaniji, kjer so prav tako določili povezanost polimorfizmov blizu gena za OPG z MKG (48). Te raziskave so potrdile, da ima gen OPG pomemben genetski vpliv pri razvoju osteoporoze.

## 2. NAMEN DELA

Osteoprotegerin je lokalni dejavnik, ki sodeluje pri uravnavanju kostne premene in ščiti kost pred pretirano osteoklastno razgradnjo. Z vezavo na RANKL inhibira diferenciacijo in aktivacijo osteoklastov. Pomanjkanje OPG lahko povzroči nastanek osteoporoze. Zaradi te vloge so OPG uvrstili med kandidatne gene, ki lahko vplivajo na MKG ter na tveganje za zlome pri ženskah in moških. Izražanje gena nadzoruje njegov promotor, ki vsebuje vezavna mesta za različne transkripcijske faktorje. Spremembe v promotorju lahko vplivajo na vezavo transkripcijskih faktorjev in posledično na količino sintetiziranega proteina.

Namen našega dela je določiti pogostost polimorfizma 245T>G v promotorski regiji gena za OPG, ugotoviti njegovo povezavo z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene v slovenski populaciji ter tako oceniti njegov klinični pomen pri razvoju osteoporoze.

V ta namen bomo:

- V raziskavo vključili 718 preiskovancev, ki jim je bila odvzeta kri, izmerjena MKG in določeni biokemični kazalci kostne premene.
- Z reakcijo PCR pomnožili začetni del promotorske regije gena za OPG in uspešnost reakcije preverili z agarozno gelsko elektroforezo.
- Z analizo RFLP določili prisotnost polimorfizma 245T>G in sicer bomo pomnoženi produkt PCR cepili z restrikcijskim encimom *HinfI*, nastale produkte pa ločili z agarozno gelsko elektroforezo.
- Odčitane genotipe preiskovancev bomo vključili v statistično analizo in določili njihov klinični pomen pri razvoju osteoporoze.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 SPLOŠNA OPOZORILA

Pri delu smo uporabljali sterilni pribor za enkratno uporabo. Pred samim delom smo potrebne epruvete in nastavke za pipete avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121°C ter nadtlaku 1 bar. Pri delu smo uporabljali avtoklavirano ultračisto vodo. Med delom smo pazili na čistočo, da bi se izognili kontaminaciji vzorcev in reagentov. Pred in po vsakem delu smo zato delovno površino in delovni pribor razkužili z 3 % natrijevim hipokloritom. Za pripravo raztopin za reakcijo PCR smo pribor in delovno komoro še 25 minut osvetljevali z UV-lučjo.

Pri delu smo uporabljali rokavice iz lateksa za enkratno uporabo. Posebno pozornost smo posvetili tudi delu z etidijevim bromidom (ETBr), ki je kancerogen. Delali smo v digestoriju in uporabljali posebne nitrilne rokavice.

### 3.2 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 718 preiskovancev, ki smo jih razdelili v naslednje podskupine:

- Moški
- Premenopavzne ženske
- Pomenopavzne ženske
  - à zdrave pomenopavzne ženske
  - à osteoporozne pomenopavzne ženske
- osteoporozne bolnice zdravljene z:
  - à raloksifenom
  - à alendronatom

Nekatere osteoporozne bolnice so začele z zdravljenjem po začetnem merjenju MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene. 56 pomenopavznih žensk z osteoporozo so eno leto zdravili z raloksifenom v odmerku 60 mg na dan. Dodatno so prejemale še holekalciferol (400 IU na dan) in kalcijev karbonat (1000 mg na dan). 52 pomenopavznih žensk z

osteoporozo so eno leto zdravili z alendronatom v odmerku 10 mg na dan. Dodatno so prejemale še kalcij (500 mg na dan) in vitamin D<sub>3</sub> (400 IU na dan).

### **3.3 MERJENJE MINERALNE KOSTNE GOSTOTE**

Vsem preiskovancem je bila odvzeta kri in izmerjena MKG kolka (BMDtot; angl. total hip bone mineral density), vratu stegenice (BMDfn; angl. femoral neck bone mineral density) in na področju ledvene hrbtenice (BMDls; lumbar spine bone mineral density) ter v serumu ali plazmi izmerjeni biokemični kazalci kostne premene.

MKG so izmerili z DXA na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, v Splošni bolnišnici Celje ali v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Na osnovi kriterijev Svetovne zdravstvene organizacije (5) ter izmerjenih vrednosti MKG so preiskovancem postavili diagnozo.

### **3.4 MERJENJE KONCENTRACIJ BIOKEMIČNIH KAZALCEV KOSTNE PREMENE**

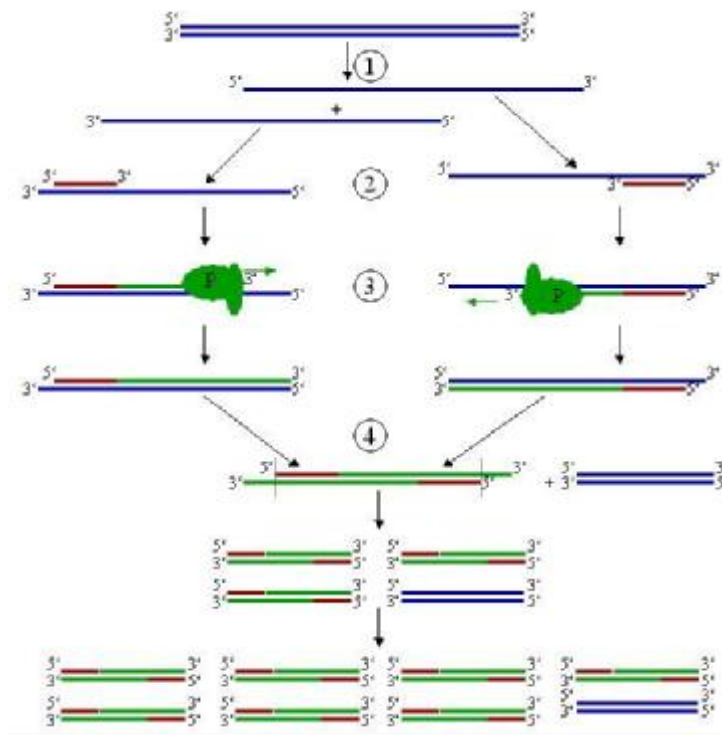
Vzorci krvi so bili odvzeti na tešče med 8:00 in 10:00 uro zjutraj. Plazma oziroma serum sta bila analizirana v rutinskem laboratoriju po navodilih proizvajalcev. Osteokalcin (OC) so v heparinizirani plazmi izmerili z uporabo kemiluminiscenčne imunokemične metode (Imulite Osteocalcin, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA). Serumsko kostno specifično alkalno fosfatazo (BALP) so izmerili z radioimunokemično metodo (Tande-R Ostase, Backman Coulter, Fullerton, CA, USA). Prokolagen I C-terminalni propeptid (CTX) so izmerili z encimsko imunološko metodo v serumu (Serum CrossLaps ELISA, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark), prav tako pa tudi serumski prosti topni RANKL (sRANKL - sRANKL ELISA, Biomedica, Vienna, Austria), OPG (Human Osteoprotegerin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine, Inc.) in katepsin K (Enzyme Immunoassay for quantitative determination of human cathepsin K; Cat. No.: BI-20432/12x8 tests/conventional 96well ELISA format). Deoksipiridinolin (DPYR) je edini biokemični kazalec, ki so ga določili v urinu, z encimsko imunološko metodo (Pyrilinks-D, Metra BioSystem Inc., Mountain View, CA).

### 3.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Cilj verižne reakcije s polimerazo (PCR) je enostavno in hitro pomnoževanje odseka DNA za nadaljnje analize (44).

Metoda PCR poteka v ciklih. Vsak cikel zajema tri faze (slika 7):

- **Denaturacija osnovne DNA.** Dvoverižna DNA se s toplotno denaturacijo razcepi na enoverižni verigi DNA ( $T = 90^{\circ}\text{C} - 96^{\circ}\text{C}$ )
- **Vezava oligonukleotidnih začetkov** na obe enovijačni DNA v odseku DNA, ki ga želimo pomnožiti ( $T = 40^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ ).
- **Encimska sinteza nove komplementarne verige DNA.** Termostabilna Taq polimeraza na osnovi zaporedja osnovne enovijačne DNA podaljšuje oligonukleotidna začetka in tako zgradi komplementarno vijačnico DNA v smeri 5' do 3' konca ( $T = 72^{\circ}\text{C}$ ).



**Slika 7:** Shematski prikaz PCR cikla. 1-denaturacija osnovne DNA. 2- prileganje oligonukleotidnih začetkov. 3- encimska sinteza komplementarne verige DNA z DNA-polimerazo. 4- zaključek prvega cikla.

Novonastale verige DNA vstopajo v naslednji cikel, kjer služijo kot matrice za nastanek novih, enakih odsekov DNA. Končno število kopij je tako enako  $2^n$ , pri čemer je  $n$  število ciklov (26, 27).

Za uspešno izvedbo reakcije PCR so potrebne naslednje sestavine:

- termostabilna DNA-polimeraza za sintezo nove DNA iz matrice;
- oligonukleotidni začetniki za začetek DNA sinteze;
- deoksinukleozid trifosfati (dNTP);
- $Mg^{2+}$ ;
- pufer za vzdrževanje pH;
- enovalentni kation, ki ga vsebuje pufer;
- genomsko DNA (preiskovana DNA) (26).

### ***3.5.1 Priprava reakcijske zmesi***

Za izvedbo reakcije PCR smo pripravili reakcijsko zmes, ki je prikazana v preglednica IV. Komponente in volumski deleži komponent za pripravo reakcijske zmesi so bili optimalno določeni v predhodnih raziskavah (22). Za reakcijo potrebujemo vzorčno DNA, ki vsebuje odsek, ki ga želimo pomnožiti. Za vsako serijo smo pripravili skupno reakcijsko zmes. Pripravljeno reakcijsko zmes smo dobro premešali in jo razdelili v naprej označene epruvete po 29  $\mu$ L. V vsako epruveto smo nato dodali 1  $\mu$ L vzorca DNA. Za vsako serijo smo iz reakcijske zmesi pripravili še slepi vzorec, ki kaže, ali je med delom prišlo do kontaminacije z DNA (negativna kontrola). V slepi vzorec nismo dodali vzorca DNA.



**Preglednica IV:** Sestava reakcijske zmesi za pomnožitev enega vzorca DNA.


KOMPONENTA	VOLUMEN (μL)
Ultra čista voda	16,88
Pufer GOLD 10x	3
dNTP	3
MgCl <sub>2</sub>	3
OPG-PR1F	1,5
OPG-PR1R	1,5
Tag	0,12
Skupni volumen	29
DNA	1
Končni volumen	30

### 3.5.2 Reakcijski pogoji

Pogoji za PCR pomnoževanje promotorske regije gena za OPG so bili določeni v predhodnih raziskavah (22). Pogoje reakcije prikazuje preglednica V. Preden smo vzorce vstavili v ciklični pomnoževalnik smo jih centrifugirali. Nato smo vzorce zložili v ciklični pomnoževalnik in izbrali program, ki smo ga vnaprej nastavili na izbrane pogoje.

**Preglednica V:** Reakcijski pogoji za pomnoževanje začetnega dela promotorja gena OPG.

STOPNJA REAKCIJE PCR	T	ČAS
Začetna denaturacija	95°C	12 min
Denaturacija	94°C	1 min
Prileganje	56°C	30 sek
Podaljševanje	72°C	1 min
Končno prileganje	72°C	7 min
Prekinitev	8°C	∞

 40x

### 3.5.3 Preverjanje uspešnosti PCR reakcije

Uspešnost PCR reakcije opredelimo glede na količino in dolžino nastalega produkta PCR. Ta dva parametra preverimo z elektroforezno ločbo na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim

ETBr. Velikost lise ocenimo s primerjavo z lisami označevalca z znanimi dolžinami fragmentov, količino nastalega produkta pa ocenimo z intenziteto lise (28).

### 3.5.3.1 Priprava agaroznega gela

Za pripravo agaroznega gela (10x15x0,5 cm) z 60 žepki smo v erlenmajerico z ozkim vratom natehtali 1,5 g agaroze in dodali 75 mL 1x TAE pufra. Erlenmajerico in zmes smo nato na tehtnici starirali. Erlenmajerico smo pokrili z urinim steklom in postavili v mikrovalovno pečico. Zmes smo segrevali, dokler ni nastala bistra raztopina brez mehurčkov. Zmes v erlenmajerici smo po segrevanju ponovno stehtali in dolili izhlapelo vodo. V digestoriju smo zmesi dodali 5  $\mu$ L ETBr, premešali in vlili v pripravljen model z vstavljenimi glavnički za žepke. Gel smo pustili stati v digestoriju 30-45 minut, da se strdi. Gel smo zaščitili pred svetlobo, saj ETBr na svetlobi razpada. Zaradi kancerogenosti EtBr smo uporabljali posebne nitrilne rokavice in delali v digestoriju.

### 3.5.3.2 Elektroforezna ločba

Gel smo potopili v 1x TAE puffer v elektroforezni kadički. Na parafilm smo si pripravili kapljice (2  $\mu$ L) nanašalnega pufra ksilencianol za vse vzorce, slepi vzorec in označevalec dolžin fragmentov. Nanašalni puffer potuje z določeno hitrostjo in omogoča spremljanje poteka elektroforeze. Vzorec obarva in poveča njegovo gostoto ter tako omogoča lažji nanos vzorca. Prvi kapljici ksilencianola smo dodali 2  $\mu$ L označevalca, naslednjim pa po 3  $\mu$ L vzorca in zadnji 3  $\mu$ L slepega vzorca. Pripravljeno kapljico smo takoj nanесли v žepok agaroznega gela. Elektroforeza je potekala 25 minut pri napetosti 90 V in stalnem toku. Po končani elektroforezi smo posneli rezultate PCR reakcije z UV dokumentacijskim sistemom ( $\lambda = 302$  nm).

### 3.5.4 Materiali in oprema

#### 3.5.4.1 PCR

##### REAGENTI:

- Delovne raztopine DNA različnih koncentracij in redčitev (redčenje 1:10 do 1:15)
- Ultra čista voda (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA, Purelab Classic)
- Ampli Taq GOLD<sup>R</sup> DNA polimeraza (Applied Biosystems, New Jersey, ZDA)
- 10x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, New Jersey, ZDA)
- 25 mM raztopina MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, New Jersey, ZDA)
- 2 mM raztopina dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega Corporation, USA);  
10 μL dATP + 10 μL dCTP + 10 μL dGTP + 10 μL dTTP + 460 μL ultra čiste vode
- Raztopine oligonukleotidnih začetkov (MWG Biotech); PR1F: 2,5 μL OPG-PR1F + 97,5 μL ultra čiste vode, PR1R: 5 μL OPG-PR1R + 95 μL ultra čiste vode  
(Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov: PR1F: 5'-CGAACCCTAGAGCAAAGTGC-3'; PR1R: 5'-TGTCTGATTGGCCCTAAAGC-3')

##### APARATURE IN PRIBOR:

- Delovna komora z UV lučko (Kron, Ljubljana, Slovenija)
- Ciklični pomnoževalnik (MWG AG Biotech, Primus 96 plus)
- Mikrocentrifuga Mikro-242 (THNICA, Železniki, Slovenija)
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Serstedt)
- 0,5 mL epruvete, avtoklavirane (Serstedt)
- Vorteks (FVL-2400N, Combi-spin, BIOSAN)

#### 3.5.4.2 Elektroforeza

##### REAGENTI:

- PCR agaroz (Sigma)

- Destilirana voda
- Etidijev bromid (Sigma)
- 50x TAE pufer: Tris-baza (Fluka); 50x koncentrat osnovne raztopine smo pripravili iz: 242,0 g Tris-baza + 57,1 g CH<sub>3</sub>COOH + 100 mL 0,5 mol/L EDTA + 1000 mL bidestilirana voda. pH smo uravnali na 8,0. Za elektroforezo in pripravo gela smo uporabili 1x TAE: 20 mL 50x TAE dolijemo 980 mL destilirane vode).
- Ocetna kislina (Carbo Erba)
- 0,5 mol/L EDTA (Fluka)
- Nanašalni pufer ksilencianol (Promega Corporation, USA)
- Označevalec dolžin DNA (Promega Corporation, USA): 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp

#### APARATURE IN PRIBOR:

- Tehtnica EXACTA 300 EB
- Mikrovalovna pečica OPTI QUICK COMPACT (MOULIMEX)
- Elektroforezne kadičke ( BioRad)
- Usmernik Pover Pac Basic (BioRad)
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Serstedt)
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Model za vlivanje gela, glavnički, erlenmajerica, urino steklo, parafilm
- Dokumentacijski sistem za slikanje gela UVI Pro in Program UVI Photo (Uvitec Ltd)

### **3.6 ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV**

Analiza dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP - angl. Restriction Fragment Length Polymorphysm) je metoda, ki se uporablja za določanje oziroma potrjevanje znanih mutacij s pomočjo restrikcijskih endonukleaz. Restrikcijske endonukleaze so encimi, ki prepoznajo štiri do osem nukleotidov dolgo zaporedje DNA in ga cepijo. Sprememba enega samega nukleotida v tem zaporedju lahko ukine cepitveno mesto restrikcijske endonukleaze. Mutacija lahko doda ali odstrani restrikcijsko mesto za določen encim, kar se kaže v številu in dolžini nastalih fragmentov DNA. Iz prisotnosti nerazcepljenih

odsekov oziroma prisotnosti produktov cepitve lahko odkrivamo spremembe v zaporedju nukleotidov (30). Zaporedje, ki ga cepi encim, ki smo ga uporabili pri analizi RFLP (restriksijski encim *Hinf*I), prikazuje slika 8.



**Slika 8:** Zaporedje, ki ga cepi restriksijski encim *Hinf*I. N - katerikoli nukleotid.

### 3.6.1 Priprava reakcijske zmesi

Za izvedbo analize RFLP pripravimo reakcijsko zmes, ki je prikazana v preglednici VI. Komponente in volumski deleži komponent za pripravo reakcijske zmesi so bili določeni v predhodnih raziskavah (29).

Skupno reakcijsko zmes smo pripravili v 1,5 mL epruveti. Encim smo vzeli iz zamrzovalnika tik pred uporabo in ga nato takoj vrnil v zamrzovalnik. Ko smo pripravili skupno reakcijsko zmes, smo po 10  $\mu\text{L}$  odpipetirali v naprej označene epruvete. Nato smo v vsako epruveto dodali 5  $\mu\text{L}$  produkta PCR. Epruvete smo centrifugirali, jih vstavili v plavajoče nosilce in inkubirali v vodni kopeli čez noč ( $T = 37^\circ\text{C}$ ).

**Preglednica VI:** Sestava reakcijske zmesi za RFLP analizo za en vzorec.

KOMPONENTA	VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )
Ultračista voda	8,2
NEBuffer 4	1,5
<i>Hinf</i> I	0,3
Skupen volumen	10,0
PCR-produkt	5,0
Končni volumen	15

### **3.6.2 Ločevanje produktov restrikcije z elektroforezo na agaroznem gelu**

Po 24 urni inkubaciji smo vzorce vzeli iz vodne kopeli in jih centrifugirali (1 min, 1000 obratov). Uspešnost in potek restrikcije smo preverili na 4 % agaroznem gelu brez vgrajenega ETBr.

#### **3.6.2.1 Priprava 4% agaroznega gela in postopek elektroforeze**

V erlenmajerico z ozkim vratom smo natehtali 3 g agaroze in dodali 75 mL 1x TAE pufra. Nadaljnji postopek priprave gela je enak postopku, ki je opisan v poglavju 3.5.3.1. Pripravili smo gel z večjimi žepki, saj je volumen nanosa večji.

Pripravljeni gel smo potopili v 1x TAE v elektroforezni kadički in v žepke nanegli vzorce, ki smo jih predhodno pomešali z 3  $\mu$ L bromfenola. Poleg vzorcev smo na gel nanegli še nerestringiran produkt PCR (negativna kontrola) in označevalec dolžin fragmentov DNA. Elektroforezo smo izvajali 45 minut pri napetosti 90 V in stalnem toku. Za detekcijo lis smo namesto dodatka ETBr gel barvali z barvilom Sybr Green I.

#### **3.6.2.2 Barvanje gela z Sybr Green I**

Z barvilom Sybr Green I smo ravnali pazljivo in previdno. Delali smo v digestoriju in uporabljali posebne nitrilne zaščitne rokavice. Sybr Green I je zelo neobstoječ na svetlobi, zato smo raztopino barvila pripravljali v steklenicah, ki ne prepuščajo svetlobe in barvali v posodi, ki smo jo zaščitili pred svetlobo. Raztopino barvila smo pripravili iz 20  $\mu$ L 10.000-kratne raztopine Sybr Greena I, ki smo ji dodali 200 mL 1x TAE pufra in dobro premešali. Gel smo položili v plastično posodo z pokrovom in ga prelili z pripravljeno raztopino Sybr Green I. Posodo smo zaščitili pred svetlobo in barvali 45 minut na stresalniku v digestoriju. Po barvanju smo rezultate posneli z UV-dokumentacijskim sistemom ( $\lambda = 302$  nm).

### 3.6.3 Materiali in oprema

#### 3.6.3.1 RFLP

##### REAGENTI

- Ultra čista voda (bidestilirana, avtoklavirana, pripravljena z aparatom ELGA, Purelab Classic)
- Pufer NEBuffer 4 (BioLabs, New England)
- Restriksijski encim *Hinf*I (BioLabs, New England)

##### APARATURE IN PRIBOR

- Centrifuga CENTRIC 150 (TEHTNICA, Železniki, SLO)
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Sersted)
- 1,5 mL epruvete, avtoklavirane (Sersted)
- Vodna kopel MEMMERT, T=37°C
- Plavajoči nosilec

#### 3.6.3.2. Elektroforeza

##### REAGENTI:

- RFLP agaroz (Sigma)
- Destilirana voda
- 50x TAE pufer: (postopek priprave opisan v poglavju 3.5.4.2)
- Ocetna kislina (Carbo Erba)
- 0,5 mol/L EDTA (Fluka)
- Nanašalni pufer bromfenol (Promega Corporation, USA)
- Označevalec dolžin DNA-PCR Marker (Promega Corporation, USA): 1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp

##### APARATURE IN PRIBOR:

- Tehnica EXACTA 300 EB

- Mikrovalovna pečica OPTI QUICK COMPACT (MOULIMEX)
- Elektroforezne kadičke ( BioRad)
- Usmernik Pover Pac Basic (BioRad)
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Serstedt)
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Model za vlivanje gela, glavnički, erlenmajerica z ozkim vratom, urino steklo
- Parafilm
- Dokumentacijski sistem za slikanje gela UVI Pro in program UVI Photo (Uvitec Ltd)

### 3.6.3.3. Barvanje gela z Sybr Green I barvilom

#### REAGENTI:

- 1x TAE pufer (postopek priprave opisan v poglavju 3.5.4.2)
- Sybr Green I (Sigma)

#### APARATURE IN PRIBOR

- Plastična posoda s pokrovom
- Stresalnik Vibromix 314 EVT (TEHTNICA, Železniki, Slovenija)
- Plastična steklenica, ki ne prepušča svetlobe
- Polavtomatske pipete Eppendorf
- Nastavki za pipete, avtoklavirani (Sersted)

## 3.7 STATISTIČNE METODE

### 3.7.1 Hardy – Weinbergovo načelo

Hardy – Weinbergovo načelo pravi, da se pogostost posameznih genotipov med generacijami ohranja. Načelo velja za razmerje genotipov v veliki populaciji, kjer se osebki naključno razmnožujejo, ni selekcije vzorcev, dodatnih mutacij in migracij (31). Za primerjavo genotipskih frekvenc smo uporabili  $\chi^2$  test.



### **3.7.2 Kolmogorov – Smirnov test normalnosti porazdelitve**

Posamezne skupine preiskovancev smo razdelili po genotipih (TT, TG in GG) in za vsako od podskupin izračunali srednje vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene. Za statistično obdelavo smo uporabili program *SPSS for Windows*, verzija 16.1. (SPSS Inc., Illinois, ZDA).

Z Kolmogorov-Smirnov testom smo preverili normalnost porazdelitve vseh izmerjenih parametrov v posamezni genotipski podskupini. Postavili smo ničelno hipotezo, da je porazdelitev izmerjenih parametrov med posameznimi genotipskimi skupinami normalna. Če je bila p vrednost večja od 0,05, smo ničelno hipotezo sprejeli in v nadaljnji statistični obdelavi uporabili parametrični test (t-test). Če je bila p vrednost manjša od 0,05, smo ničelno hipotezo zavrnil in v nadaljnji statistični obdelavi uporabili neparametrični test (Kruskal-Wallisov test).

### **3.7.3 Statistična analiza razlik v parametrih med genotipskimi podskupinami**

Genotip GG sta imeli samo dve preiskovanki, zato smo genotipe GG združili z genotipi TG in primerjali povprečne vrednosti MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene med genotipskima podskupinama TT in TG+GG.

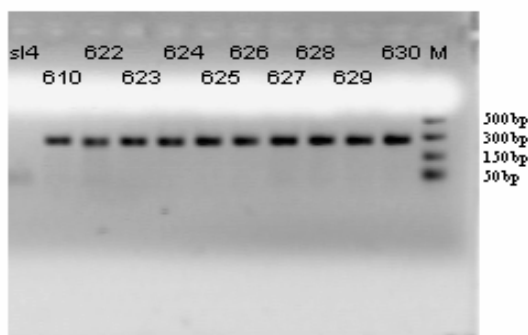
Za parametre (MKG in biokemične kazalce kostne premene), ki se med genotipskima podskupinama v posamezni skupini preiskovancev porazdeljujejo normalno, smo uporabili t-test in za parametre, ki se med genotipskima podskupinama ne porazdeljujejo normalno, Kruskal-Wallisov test. Če je bila vrednost  $p > 0,05$  smo zaključili, da med genotipskimi podskupinami ni statistično značilne razlike pri analizirani spremenljivki. Pri vrednostih  $p < 0,05$  pa smo pokazali statistično značilno razliko pri določenem parametru med genotipskimi podskupinami v skupini preiskovancev.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 OPTIMIZCIJA POGOJEV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

Reakcijo PCR smo izvedli za vse vzorce enako, ne glede na koncentracijo in redčenje vzorca izolirane DNA z komponentami in volumskimi deleži komponent, ki so bili dolženi v predhodnih raziskavah (22). Uspešno izvedena reakcija PCR nam da pomnoženi fragment zelene dolžine in koncentracije. Uspešnost reakcije smo preverili na 2 % agaroznem gelu z vgrajenim ETBr. Negativno nabite molekule DNA potujejo pod vplivom električnega toka proti pozitivno nabiti anodi in se ločujejo po velikosti. Manjše molekule potujejo hitreje, večje molekule pa počasneje. Na gel smo poleg vzorcev in slepega vzorca nanegli še označevalec dolžin z znanimi dolžinami fragmentov (1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp). S pomočjo označevalca velikosti fragmentov smo lahko na podlagi položaja lise produkta PCR potrdili dolžino preiskovanega fragmenta (271 bp). V agarozni gel vgrajen ETBr nam je omogočal detekcijo lis. ETBr interkelira med bazne pare DNA in tako absorbira UV žarke valovne dolžine 302 nm in emitira svetlobo. Jakost emitirane svetlobe smo posneli in opazili kot močno ali šibko obarvanje lise. Jakost barve lise je sorazmerna s koncentracijo nastalega fragmenta.

Želeni fragment smo po izbranih pogojih uspešno pomnožili pri vseh vzorcih in zato nismo rabili posebej optimirati pogojev reakcije. Lise so bile jasne, brez nespecifičnih produktov in v zadostni količini za nadaljnjo analizo RFLP. Primer uspešne analize prikazuje slika 9.

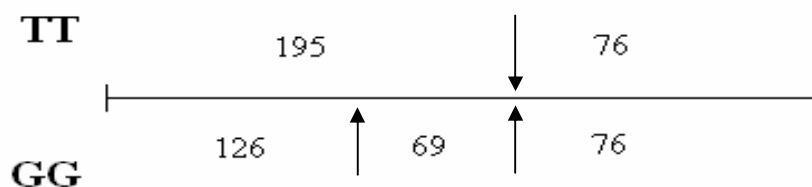


**Slika 9:** Rezultat uspešne elektroforeze PCR produktov desetih vzorcev na 2% agaroznem gelu z vgrajenim ETBr. sl4=slepi vzorec, M=označevalec dolžin.

## 4.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV ANALIZE DOLŽIN

### RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV IN DOLOČANJE GENOTIPOV

Za določitev genotipov preiskovancem smo uporabili metodo RFLP. Komponente in volumski deleži komponent so bili določeni v predhodnih raziskavah (29). Restriksijski encim, ki smo ga uporabili pri analizi RFLP, spozna določeno zaporedje v genskem zapisu in ga razcepi. Rezultat so fragmenti DNA različnih dolžin, ki smo jih med seboj ločili z elektroforezo na agaroznem gelu. Mesta cepitev 271 bp dolgega odseka promotorske regije gena za OPG z restriksijsko endonukleazo *Hinf*I prikazuje slika 10.



**Slika 10:** Cepitvena mesta 271 bp dolgega odseka promotorske regije gena za OPG za restriksijsko endonukleazo *Hinf*I.

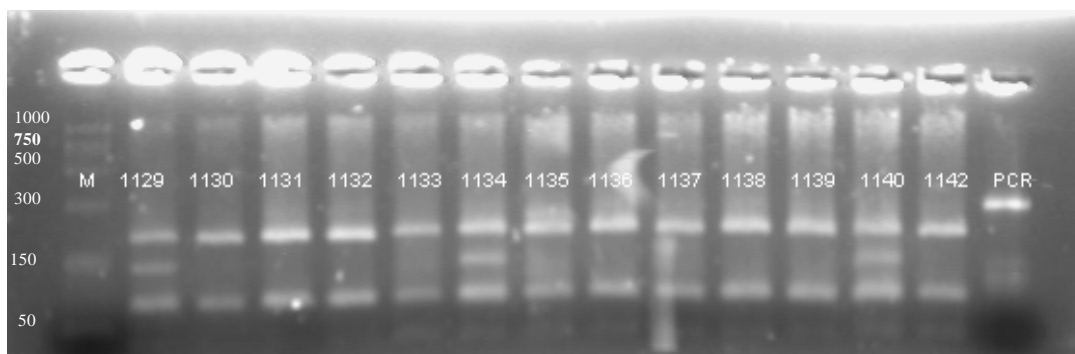
Nastali fragmenti, ki so značilni za posamezen genotip, predstavljajo lise na agaroznem gelu. Dolžine nastalih fragmentov pri posameznih genotipih prikazuje preglednica VII.

**Preglednica VII:** Preglednica prikazuje dolžine fragmentov pri posameznem genotipu.

GENOTIP	VELIKOSTI FRAGMENTOV (bp)
TT	195, 76
TG	195, 126, 76, 69
GG	126, 76, 69

Zaradi majhne razlike v velikosti posameznih fragmentov smo za njihovo ločbo uporabili 4 % agarozni gel brez ETBr, ki smo ga po elektroforezi barvali z barvilom Sybr Green I in ga posneli pod UV lučjo. Za vse preiskovance smo uspešno določili genotipe in nam tako

ni bilo potrebno pogojev reakcije posebej optimirati (ugotavljati ustrezne količine *Hinfl*, ustreznih pogojev elektroforeze in načina detekcije – barvanja lis). Primer uspešne analize RFLP prikazuje slika 10. Majhna razlika v velikosti med fragmentom, dolgim 69 bp, in fragmentom, dolgim 76 bp, povzroči, da se fragmenta na 4 % gelu ne ločita in sta vidna kot 1 lisa. Vendar pa združitev dveh fragmentov v eno liso ni vplivala na določitev genotipa, saj za njegovo določitev zadostujeta zgornji dve lisi.



**Slika 10:** Rezultat analize RFLP na 4% agaroznem gelu. Vzorci 1129, 1134, 1140 prikazujejo primer genotipa TG, ostali vzorci prikazujejo genotip TT.

### 4.3 UGOTAVLJANJE POGOSTOSTI POLIMORFIZMA 245T>G

Genški polimorfizem pomeni prisotnost dveh ali več različnih genotipov v neki populaciji in se pojavlja pri več kot 1 % populacije. Pogostost polimorfizma 245T>G v genu za OPG v slovenski populaciji smo izračunali na osnovi dobljenih rezultatov genotipizacije 718 vzorcev izolirane DNA (Priloga 1). Relativne frekvence genotipov v celotni skupini preiskovancev so 87,5% : 12,2% : 0,3 % za genotipe TT : TG : GG. Preglednica VIII prikazuje relativne frekvence genotipov v posamezni podskupini preiskovancev.

**Preglednica VIII:** Relativne frekvence (%) genotipov za preiskovani polimorfizem v posamezni skupini preiskovancev.

SKUPINA	TT	TG	GG
Moški	85,5	14,5	0
Premenopavzne ženske	87,3	12,7	0
Pomenopavzne ženske	87,9	11,7	0,4
Zdrave pomenopavzne ženske	89,8	9,8	0,4
Osteoporozne pomenopavzne ženske	86,0	13,6	0,4
Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom	87,5	12,5	0
Pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom	88,5	11,5	0

Tudi druge raziskave so pokazale podobne relativne frekvence genotipov. Relativne frekvence genotipov, ki jih je določila Arko s sodelavci v svoji raziskavi so 89,3 % : 10,7 % : 0% za genotipe TT : TG : GG (22). Langdahlova s sodelavci je v svoji raziskavi določila naslednje relativne frekvence genotipov: 87,6% : 11,6% : 0,7% za genotipe TT : TG : GG (23). Določene so tudi relativne frekvence posameznega genotipa pri posamezni rasi (Preglednica IX) (37), ki kažejo na odstopanje relativnih frekvenc pri Afroameričanih in raznolikost pogostosti polimorfizma med rasami.

**Preglednica IX:** Relativne frekvence posameznega genotipa pri Evropejcih, Azijcih in Afroameričanih.

	TT	TG	GG
<b>Evropejci</b>	88,3	10,0	0,17
<b>Azijci</b>	82,2	15,6	0,22
<b>Afroameričani</b>	69,6	30,4	0,00

S  $\chi^2$  testom smo nato potrdili statistično neznačilno razliko med opazovano genotipsko frekvenco, ki smo jo dobili pri eksperimentalnem delu, in pričakovano gensko frekvenco, ki smo jo izračunali po Hardy-Weinberg-ovem načelu. To pomeni, da se v slovenski populaciji frekvence genotipov za proučevani polimorfizem porazdeljujejo v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem.

#### **4.4 OCENA POVEZANOSTI POLIMORFIZMA 245T>G V GENU ZA OPG Z MKG IN BIOKEMIČNIMI KAZALCI KOSTNE PREMENE**

Preiskovance smo razdelili v pet skupin in sicer:

- Moški, n = 117
- Premenopavzne ženske, n = 55
- Pomenopavzne ženske, n = 478
  - à zdrave pomenopavzne ženske, n = 235
  - à osteoporozne pomenopavzne ženske, n = 243
- Pomenopavzne ženske, zdravljene z raloksifenom, n = 56
- Pomenopavzne ženske, zdravljene z alendronatom, n = 52

Preiskovanke, ki so bile zdravljene z alendronatom ali raloksifenom, so bile pred zdravljenjem vključene v skupino osteoporoznih pomenopavznih žensk.

Vsem preiskovancem je bila izmerjena MKG vratu stegenice (BMDfn), kolka (BMDtot) in predela ledvene hrbtenice (BMDls) ter biokemični kazalci kostne premene. Klinične značilnosti posameznih skupin preiskovancev prikazujeta preglednica X.



#### 4.4.1 Skupina moških

V skupino moških smo vključili 117 preiskovancev, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX in OPG. Povprečne vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statističnega testa prikazuje preglednica XI. Različno število preiskovancev (N) pri posameznem parametru je posledica tega, da vsem preiskovancem niso bili izmerjeni vsi parametri.

**Preglednica XI:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene pri moških ter rezultati statistične obdelave (N=število preiskovancev, MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = MKG predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = Prokolagen I C-terminalni propeptid).

Genotip	*MKGfn (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGtot (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGls (kg/m <sup>2</sup> )	*RANKL (pmol/L)	*OC ( $\mu$ g/L)	*CTX (pmol/L)	*OPG (pmol/L)
<b>TT</b>	0,817 $\pm$ 0,164 (N=78)	1,019 $\pm$ 0,159 (N=78)	1,050 $\pm$ 0,174 (N=100)	0,18 $\pm$ 0,11 (N=20)	9,9 $\pm$ 5,4 (N=20)	2109 $\pm$ 891 (N=15)	5,1 $\pm$ 1,3 (N=20)
<b>TG</b>	0,781 $\pm$ 0,117 (N=12)	1,063 $\pm$ 0,206 (N=12)	1,099 $\pm$ 0,188 (N=16)	0,16 $\pm$ 0,11 (N=5)	8,2 $\pm$ 4,6 (N=5)	1687 $\pm$ 1632 (N=5)	7,0 $\pm$ 1,3 (N=5)
<b>p</b>	<b>0,452</b>	<b>0,395</b>	<b>0,306</b>	<b>0,664</b>	<b>0,532</b>	<b>0,467</b>	<b>0,008</b>

\* t-test

V skupini moških nismo dokazali statistično značilne razlike v MKG med posameznima genotipoma. Prav tako nismo dokazali statistično značilne razlike med genotipom TT in TG pri vrednostih za RANKL, OC in CTX. Statistično značilno razliko med genotipom TT in TG ( $p=0,008$ ) smo dokazali za vrednosti OPG. Srednja vrednost OPG preiskovancev z genotipom TG (7,0 pmol/L  $\pm$  1,3 pmol/L) je značilno višja od srednje vrednosti OPG preiskovancev z genotipom TT (5,1 pmol/L  $\pm$  1,3 pmol/L), kar kaže na vpliv polimorfizma na koncentracijo OPG pri moških. Polimorfizem 245T>G bi lahko s spremembo nukleotida povzročil učinkovitejšo vezavo transkripcijskih dejavnikov ter tako povečal izražanje gena za OPG, kar bi lahko pojasnilo povišanje koncentracije OPG v serumu. Zaradi majhnega števila preiskovancev z genotipom TG (14,5 % oz. 17 preiskovancev) ima pokazani vpliv genotipa na koncentracijo OPG omejen pomen.



#### 4.4.2 Skupina premenopavznih žensk

V statistično analizo smo vključili 55 premenopavznih žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti RANKL, osteokalcina, CTX, kostno specifične alkalne fosfataze, OPG in katepsina K. Srednje vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XII.

**Preglednica XII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri premenopavznih ženskah (MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = Prokolagen I C-terminalni propeptid, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, RANKL = ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OPG = osteoprotegerin).

Genotip	*MKGfn (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGtot (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGls (kg/m <sup>2</sup> )	**RANKL (pmol/L)	*OC ( $\mu$ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP ( $\mu$ g/L)	*OPG (pmol/L)	**katepsin K (pmol/L)
<b>TT</b>	0,817 $\pm$ 0,164 (N=48)	1,019 $\pm$ 0,159 (N=48)	1,050 $\pm$ 0,174 (N=48)	0,18 $\pm$ 0,11 (N=48)	9,9 $\pm$ 5,4 (N=48)	2109 $\pm$ 891 (N=47)	5,1 $\pm$ 1,3 (N=48)	317,5 $\pm$ 57,7 (N=48)	9,7 $\pm$ 21,9 (N=48)
<b>TG</b>	0,781 $\pm$ 0,117 (N=7)	1,063 $\pm$ 0,206 (N=6)	1,099 $\pm$ 0,188 (N=7)	0,16 $\pm$ 0,11 (N=7)	8,2 $\pm$ 4,6 (N=7)	1687 $\pm$ 1632 (N=7)	7,0 $\pm$ 1,3 (N=7)	292,3 $\pm$ 40,4 (N=7)	4,1 $\pm$ 4,3 (N=7)
<b>p</b>	<b>0,303</b>	<b>0,111</b>	<b>0,373</b>	<b>0,866</b>	<b>0,505</b>	<b>0,425</b>	<b>0,294</b>	<b>0,270</b>	<b>0,686</b>

\* t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

V skupini premenopavznih žensk nismo določili statistično značilne razlike med genotipoma za posamezen parameter in torej nismo dokazali povezanosti polimorfizma niti z MKG, niti z biokemičnimi kazalci kostne premene.

#### 4.4.3 Skupina pomenopavznih žensk

Skupino pomenopavznih žensk predstavlja 478 žensk, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti CTX, osteokalcina, kostno specifične alkalne fosfataze, in OPG. Srednje vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XIII.

**Preglednica XIII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri pomenopavznih ženskah (MKG<sub>fn</sub> = MKG vratu stegenice, MKG<sub>tot</sub> = MKG kolka, MKG<sub>ls</sub> = predela ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = Prokolagen I C-terminalni propeptid, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, RANKL = ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OPG = osteoprotegerin).

Genoti p	*MKG <sub>fn</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	*MKG <sub>tot</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	*MKG <sub>ls</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	**RANKL (pmol/L)	**OC ( $\mu$ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP ( $\mu$ g/L)	**OPG (pmol/L)
<b>TT</b>	0,696 $\pm$ 0,123 (N=420)	0,834 $\pm$ 0,138 (N=418)	0,860 $\pm$ 0,160 (N=418)	0,38 $\pm$ 0,52 (N=148)	21,2 $\pm$ 11,2 (N=138)	4055 $\pm$ 2069 (N=142)	12,2 $\pm$ 5,1 (N=141)	105,3 $\pm$ 182,7 (N=186)
<b>TG</b>	0,675 $\pm$ 0,141 (N=56)	0,831 $\pm$ 0,186 (N=56)	0,820 $\pm$ 0,193 (N=56)	0,27 $\pm$ 0,37 (N=19)	28,5 $\pm$ 20,3 (N=14)	4367 $\pm$ 2263 (N=21)	13,2 $\pm$ 6,1 (N=18)	102,8 $\pm$ 197,5 (N=24)
<b>GG</b>	0,673 $\pm$ 0,046 (N=2) <sup>1</sup>	0,824 $\pm$ 0,058 (N=2) <sup>1</sup>	0,964 $\pm$ 0,112 (N=2) <sup>1</sup>	/	/	/	/	/
<b>p</b>	<b>0,111</b>	<b>0,529</b>	<b>0,048</b>	<b>0,268</b>	<b>0,475</b>	<b>0,525</b>	<b>0,430</b>	<b>0,814</b>

t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

<sup>1</sup>Preiskovanki z genotipom GG smo v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom TG. Nastali dve genotipski podskupini (TT vs. TG + GG) smo primerjali s t-testom.

Povprečna vrednost MKG<sub>ls</sub> je pri pomenopavznih ženskah z genotipom TT (0,860  $\pm$  0,160 kg/m<sup>2</sup>) višja kot pri ženskah z genotipom TG (0,820  $\pm$  0,193 kg/m<sup>2</sup>) in je statistično značilna (p=0,048). Sklepamo lahko, da imajo ženske z genotipom TT višje vrednosti MKG in tako nižje tveganje za nastanek osteoporoze oz. zlome. Ker smo genotip GG določili pri samo dveh pomenopavznih ženskah, smo ti dve preiskovanki sicer prej visoko MKG v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom TG. Za potrditev pomena in vloge genotipa GG bi morali v nadaljnje raziskave vključiti večjo skupino preiskovank.

Za ostale parametre nismo dokazali statistično značilnih razlik v povprečnih vrednostih med genotipi.

Skupino pomenopavznih žensk smo razdelili v skupino zdravih pomenopavzni žensk in skupino bolnih pomenopavznih žensk (ženske z osteoporozo). Diagnoza je bila postavljena na osnovi merjenja MKG. Znižanje MKG za 2,5 ali več standardne deviacije (SD) od največje MKG v zgodnji odrasli dobi, z upoštevanjem spola in rase pomeni diagnozo osteoporoza (5).

#### 4.4.3.1 Zdrave pomenopavzne ženske

Skupina zdravih pomenopavznih žensk zajema 235 preiskovank, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti CTX, osteokalcina, kostno specifične alkalne fosfataze, in OPG. Srednje vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XIV.

**Preglednica XIV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri zdravih pomenopavznih ženskah (MKG<sub>fn</sub> = MKG vratu stegenice, MKG<sub>tot</sub> = MKG kolka, MKG<sub>ls</sub> = področja ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = Prokolagen I C-terminalni propeptid, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza, OPG = osteoprotegerin, RANKL = ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika  $\kappa$ B).

Genoti P	*MKG <sub>fn</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	*MKG <sub>tot</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	*MKG <sub>ls</sub> (kg/m <sup>2</sup> )	**RANKL (pmol/L)	*OC ( $\mu$ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP ( $\mu$ g/L)	**OPG (pmol/L)
<b>TT</b>	0,763 $\pm$ 0,121 (N=211)	0,910 $\pm$ 0,129 (N=210)	0,972 $\pm$ 0,137 (N=210)	0,39 $\pm$ 0,49 (N=95)	15,4 $\pm$ 5,7 (N=71)	4037 $\pm$ 1899 (N=91)	12,0 $\pm$ 4,0 (N=40)	147,6 $\pm$ 168,1 (N=95)
<b>TG</b>	0,787 $\pm$ 0,129 (N=23)	0,973 $\pm$ 0,191 (N=23)	0,998 $\pm$ 0,164 (N=23)	0,27 $\pm$ 0,28 (N=10)	10,6 $\pm$ 4,8 (N=4)	2959 $\pm$ 1936 (N=9)	9,9 $\pm$ 2,5 (N=3)	128,2 $\pm$ 201,9 (N=10)
<b>GG</b>	0,705 (N=1) <sup>1</sup>	0,865 (N=1) <sup>1</sup>	0,884 (N=1) <sup>1</sup>	/	/	/	/	/
<b>p</b>	<b>0,427</b>	<b>0,068</b>	<b>0,512</b>	<b>0,559</b>	<b>0,083</b>	<b>0,108</b>	<b>0,396</b>	<b>0,670</b>

\* t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

<sup>1</sup>Preiskovanko z genotipom GG smo v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom TG. Nastali dve skupini genotipski podskupini (TT vs. TG + GG) smo primerjali s t-testom.

V skupini zdravih pomenopavznih žensk smo opazili nizke vrednosti p pri MKG kolka ( $p=0,068$ ) in koncentraciji osteokalcina ( $p=0,083$ ). Vrednosti MKG kolka so pri preiskovankah z genotipom TT ( $0,910 \pm 0,129$  kg/m<sup>2</sup>) nižje od vrednosti MKG kolka pri preiskovankah z genotipom TG ( $0,973 \pm 0,191$  kg/m<sup>2</sup>). Srednja vrednost koncentracije osteokalcina je pri heterozigotih TG ( $10,6 \pm 4,8$   $\mu$ g/L) nižja kot pri homozigotih TT ( $15,4 \pm 5,7$   $\mu$ g/L), kar kaže na manjšo tvorbo kostnine pri heterozigotih TG. Manjša tvorba je običajno povezana tudi z manjšo razgradnjo kostnine in v naši skupini imajo preiskovanke z genotipom TG dejansko večjo MKG, vendar razlika ni statistično značilna. Rezultati statistične analize so zaradi majhnega števila preiskovank z genotipom TG manj zanesljivi in bi jih bilo potrebno potrditi na večji skupini preiskovank. Genotip GG predstavlja le ena

preiskovanka in smo jo zato vključili v skupino genotipov TG. Tudi pomen genotipa GG bi morali proučiti na večji skupini preiskovancev.

Za ostale parametre nismo dokazali statistično značilnih razlik v srednjih vrednostih parametrov med posameznimi genotipi.

#### 4.4.3.2 Osteoporozne pomenopavzne ženske

Skupino bolnih pomenopavznih žensk zajema 243 preiskovank, ki smo jim izmerili MKG vratu stegenice, kolka in področja ledvene hrbtenice ter serumske vrednosti CTX, osteokalcina, kostno specifične alkalne fosfataze, in OPG. Srednje vrednosti izmerjenih parametrov in rezultate statistične obdelave prikazuje preglednica XV.

**Preglednica XV:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah (MKGfn = MKG vratu stegenice, MKGtot = MKG kolka, MKGls = MKG področja ledvene hrbtenice, OC = osteokalcin, CTX = Prokolagen I C-terminalni propeptid, BALP = kostno specifična alkalna fosfataza RANKL = ligand receptorja aktivatorja jedrnega dejavnika  $\kappa$ B, OPG = osteoprotegerin).

Genoti P	*MKGfn (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGtot (kg/m <sup>2</sup> )	*MKGls (kg/m <sup>2</sup> )	**RANKL (pmol/L)	*OC ( $\mu$ g/L)	*CTX (pmol/L)	*BALP ( $\mu$ g/L)	**OPG (pmol/L)
TT	0,628 $\pm$ 0,083 (N=209)	0,757 $\pm$ 0,099 (N=208)	0,748 $\pm$ 0,085 (N=208)	0,35 $\pm$ 0,58 (N=53)	27,2 $\pm$ 12,5 (N=67)	4089 $\pm$ 2362 (N=51)	12,2 $\pm$ 5,5 (N=101)	61,2 $\pm$ 187,9 (N=91)
TG	0,597 $\pm$ 0,085 (N=33)	0,732 $\pm$ 0,100 (N=33)	0,697 $\pm$ 0,083 (N=33)	0,27 $\pm$ 0,47 (N=9)	35,7 $\pm$ 19,6 (N=10)	5424 $\pm$ 1935 (N=12)	13,8 $\pm$ 6,4 (N=15)	84,7 $\pm$ 199,9 (N=14)
GG	0,640 (N=1) <sup>1</sup>	0,783 (N=1) <sup>1</sup>	1,043 (N=1) <sup>1</sup>	/	/	/	/	/
p	<b>0,029</b>	<b>0,141</b>	<b>0,007</b>	<b>0,525</b>	<b>0,068</b>	<b>0,074</b>	<b>0,300</b>	<b>0,932</b>

\* t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

<sup>1</sup>Preiskovanko z genotipom GG smo v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom TG. Nastali dve genotipski podskupini (TT vs. TG + GG) smo primerjali s t-testom.

V skupini osteoporoznih pomenopavznih žensk smo dokazali statistično značilno razliko pri MKGfn ( $p=0,029$ ) in MKGls ( $p=0,007$ ) med posameznimi genotipi, torej polimorfizem vpliva na MKG v predelu vratu stegenice in ledvene hrbtenice. Genotip GG ima samo ena preiskovanka, kar ne odraža značilnosti tega genotipa in na podlagi le enega primera ne

moremo vleči zaključkov, zato smo jo v statistični analizi priključili preiskovankam z genotipom TG.

Pomembna je primerjava homozigotov TT in heterozigotov TG. Homozigoti TT ( $0,748 \pm 0,085 \text{ kg/m}^2$ ) imajo statistično značilno višje vrednosti MKG predela ledvene hrbtenice od heterozigotov TG ( $0,697 \pm 0,083 \text{ kg/m}^2$ ), prav tako imajo homozigoti TT ( $0,628 \pm 0,083 \text{ kg/m}^2$ ) statistično značilno višje vrednosti MKG vratu stegenice od heterozigotov TG ( $0,597 \pm 0,085$ ). Opazimo tudi višje vrednosti MKG kolka, ki pa niso statistično značilne. Določili smo nizke p vrednosti za vrednosti CTX ( $p=0,074$ ) in OC ( $p=0,068$ ). Vrednosti CTX in OC so pri genotipih TG višje (CTX= $5424 \pm 1935 \text{ pmol/L}$  in OC= $35,7 \pm 19,6 \mu\text{g/L}$ ) od vrednosti pri genotipih TT ( $4089 \pm 2362 \text{ pmol/L}$  in OC= $27,2 \pm 12,5 \mu\text{g/L}$ ), kar kaže na povečano tvorbo (OC) in razgradnjo (CTX) pri genotipih TG. Ker imajo genotipi TG nižjo MKG na vseh treh mestih skeleta je jasno, da sta pospešena procesa razgradnje in tvorbe, vendar tvorba očitno ne dohaja razgradnje kostnine.

Za ostale parametre v skupini bolnih pomenopavznih žensk nismo določili statistično značilne razlike med genotipi.

#### **4.4.4 Farmakogenetska analiza**

Nekatere osteoporozne pomenopavzne ženske so se po postavljeni diagnozi zdravile z raloksifenom ali alendronatom. MKG in biokemične kazalce kostne premene smo jim izmerili pred zdravljenjem in po 1 letu zdravljenja. V naši raziskavi smo poskušali ugotoviti, ali je polimorfizem 245T>G povezan z odzivnostjo na zdravljenje z raloksifenom in alendronatom.

##### **4.4.4.1 Zdravljene z raloksifenom**

V skupino je vključenih 56 bolnih pomenopavznih žensk, ki so se eno leto zdravile z raloksifenom. MKG ter biokemične kazalce osteokalcin, BALP in CROSS (prečna premereževalca – piridinolin in deokspiridinolin) smo jim izmerili pred začetkom zdravljenja in po zdravljenju. V preglednici XVI so prikazane srednje vrednosti sprememb parametrov za posamezen genotip in rezultati statističnih testov .

**Preglednica XVI:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z raloksifenom (dMKGfn = sprememba MKG vratu stegenice po 1 letu zdravljenja, dMKGtot = sprememba MKG kolka po 1 letu zdravljenja, dMKGls = sprememba MKG področja ledvene hrbtenice po 1 letu zdravljenja, dOC = sprememba osteokalcin po 1 letu zdravljenja, dBALP = sprememba kostno specifične alkalne fosfataze po 1 letu zdravljenja).

Genotip	*dMKGfn (kg/m <sup>2</sup> )	**dMKGtot (kg/m <sup>2</sup> )	*dMKGls (kg/m <sup>2</sup> )	*dOC (μg/L)	*dCROSS (%)	**dBALP (μg/L)
TT	1,383 $\pm$ 5,179 (N=49)	1,279 $\pm$ 9,568 (N=49)	2,265 $\pm$ 4,443 (N=49)	-24,2 $\pm$ 18,9 (N=48)	-27,9 $\pm$ 27,6 (N=48)	-19,6 $\pm$ 30,2 (N=41)
TG	3,223 $\pm$ 5,436 (N=7)	-13,937 $\pm$ 33,212 (N=7)	0,746 $\pm$ 4,906 (N=7)	-26,7 $\pm$ 23,9 (N=7)	-15,1 $\pm$ 34,7 (N=7)	-29,2 $\pm$ 10,2 (N=7)
p	<b>0,407</b>	<b><u>0,069</u></b>	<b>0,386</b>	<b>0,749</b>	<b>0,270</b>	<b>0,492</b>

\* t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

V skupini bolnih pomenopavznih žensk, zdravljenih z raloksifenom, nismo dokazali statistično značilnih razlik v spremembah srednjih vrednosti parametrov posameznega genotipa. Pri bolnicah, ki se zdravijo, pričakujemo pri ponovnem merjenju MKG višje vrednosti MKG od vrednosti, izmerjenih pred zdravljenjem. Pri bolnicah zdravljenih z raloksifenom, ki smo jim določili genotip TG smo pri meritvah MKG kolka (MKGtot) po zdravljenju opazili znatno znižanje vrednosti MKG kolka (-13,973  $\pm$  33,212 kg/m<sup>2</sup>) v primerjavi z MKG kolka pri genotipi TT (1,279  $\pm$  9,568 kg/m<sup>2</sup>), kar kaže na neodzivnost na zdravljenje. Vrednost p je nizka (p=0,069) vendar ni statistično značilna. Za potrditev bi bila potrebna analiza na večjem številu preiskovank.

#### 4.4.4.2 Zdravljene z alendronatom

V statistično raziskavo smo vključili 52 bolnih pomenopavznih žensk, ki so se zdravile z alendronatom v obdobju enega leta. MKG ter biokemične kazalce osteokalcin, BALP in deoksipiridinolin smo jim izmerili pred začetkom zdravljenja in po zdravljenju. V preglednici XVII so prikazane srednje vrednosti sprememb parametrov za posamezen genotip in rezultati statističnih testov .

**Preglednica XVII:** Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) sprememb MKG in biokemičnih kazalcev kostne premene ter rezultati statistične obdelave pri osteoporoznih pomenopavznih ženskah, zdravljenih z alendronatom (dMKGfn = sprememba MKG vratu stegenice po 1 letu zdravljenja, dMKGtot = sprememba MKG kolka po 1 letu zdravljenja, dMKGls = sprememba MKG predela ledvene hrbtnice po 1 letu zdravljenja, dOC = sprememba osteokalcina po 1 letu zdravljenja, dBALP = sprememba kostno specifične alkalne fosfataze po 1 letu zdravljenja, dDYPR = sprememba deoksiipiridinolina po 1 letu zdravljenja).

<b>Genotip</b>	<b>**dMKGtot</b> (kg/m <sup>2</sup> )	<b>*dMKGls</b> (kg/m <sup>2</sup> )	<b>*dOC</b> ( $\mu$ g/L)	<b>*dDypr</b> (%)	<b>**dBALP</b> ( $\mu$ g/L)
<b>TT</b>	4,476 $\pm$ 3,262 (N=40)	6,685 $\pm$ 4,473 (N=40)	56,3 $\pm$ 22,1 (N=40)	69,9 $\pm$ 32,0 (N=43)	45,0 $\pm$ 29,9 (N=31)
<b>TG</b>	2,660 $\pm$ 2,406 (N=6)	5,758 $\pm$ 4,828 (N=6)	55,8 $\pm$ 23,2 (N=6)	71,1 $\pm$ 21,2 (N=5)	43,9 $\pm$ 8,8 (N=4)
<b>p</b>	<b>0,198</b>	<b>0,641</b>	<b>0,954</b>	<b>0,935</b>	<b>0,325</b>

\* t-test, \*\* Kruskal-Wallis test

V skupini bolnih pomenopavznih žensk zdravljenih z alendronatom nismo dokazali statistično značilnih razlik med parametri pri obeh genotipih, torej razlik v odzivnosti na zdravljenje z alendronatom pri polimorfizmu 245T>G nismo pokazali. Pri obeh genotipih smo opazili zvišanje MKG, kar kaže na učinkovito zdravljenje.

## 5. SKLEP

OPG je protein, ki sodeluje v kostni premeni in ščiti kost pred osteoklastno razgradnjo. Količina sintetiziranega proteina je odvisna od izražanja njegovega gena, ki ga nadzoruje njegov promotor z vezavnimi mesti za različne transkripcijske faktorje. Spremembe v promotorju lahko privedejo do spremembe vezavnih mest za transkripcijske faktorje in tako vplivajo na količino sintetiziranega proteina. Cilj naše raziskave je bil določiti pogostost polimorfizma 245T>G v promotorski regiji gena za OPG in ugotoviti njegovo povezanost z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene.

V raziskavo smo vključili 718 preiskovancev, pri katerih smo z metodo RFLP določili genotipe in naslednje relativne frekvence (%) genotipov TT : TG : GG = 87,5 % : 12,2 % : 0,3 %. V skupini moških smo dokazali vpliv polimorfizma na koncentracijo OPG ( $p=0,008$ ). Vrednosti OPG pri moških z genotipom TT so statistično značilno nižje od vrednosti OPG pri moških z genotipom TG. V skupini pomenopavzni žensk smo določili statistično značilno razliko ( $p=0,048$ ) v vrednostih za MKG predela ledvene hrbtenice. Vrednosti MKG predela ledvene hrbtenice so pri preiskovankah z genotipom TT statistično značilno višje kot pri preiskovankah z genotipom TG. V skupini osteoporoznih pomenopavzni žensk smo dokazali vpliv polimorfizma na vrednosti MKG predela ledvene hrbtenice ( $p=0,007$ ) in MKG vratu stegenice ( $p=0,029$ ). Vrednosti MKG predela ledvene hrbtenice in vratu stegenice so pri osteoporoznih pomenopavzni ženskah z genotipom TG statistično značilno nižje od vrednosti pri osteoporoznih pomenopavzni ženskah z genotipom TT. V ostalih skupinah preiskovancev nismo dokazali povezanosti polimorfizma 245T>G v genu za OPG z MKG in biokemičnimi kazalci kostne premene. V skupini moških, premenopavzni žensk ter osteoporoznih žensk, zdravljenih z raloksifenom ali alendronatom, je morebiten vzrok, da povezave nismo dokazali, majhno število preiskovancev.

Naši rezultati predstavljajo prispevek k pojasnjevanju genetskih vplivov na nagnjenost k osteoporozi. Polimorfizem 245T>G v genu za OPG ima klinično pomemben vpliv na razvoj osteoporoze pri starejših moških in osteoporoznih pomenopavzni ženskah, vendar bi ta dognanja morali potrditi na večji skupini preiskovancev. Potrditev povezave



proučevanega polimorfizma z razvojem osteoporoze bi omogočila uporabo polimorfizma 245T>G kot genetskega označevalca ali pa bi gen za OPG predstavljal potencialno novo tarčo za zdravila za zdravljenje osteoporoze.

## 6. LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, Histologija in fiziologija, 1. izdaja, Littera Picta d.o.o, Ljubljana, 2007: 35-37
2. Kocijančič A: Presnovne bolezni kosti. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, 3. izdaja, Littera Picta d.o.o., Ljubljana, 2005: 898-900, 916-924
3. Kocijančič A: Osteoporoza, 1. natis, Posebne edicije Feniks, Ljubljana 1989
4. Dahmane R: Ilustrirana anatomija, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1998: 30-54
5. Kocijančič A: Osteoporoza: diagnostika in zdravljenje. Farmacevtski vestnik 1999; 50:1-6
6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423: 337-342
7. Roger Smith R, Wordsworth P: Clinical and biochemical disorders of the skeleton, 1.izdaja, Oxford University Press, USA, 2005: 5-158
8. Henry JB: Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed., Sunder, USA, 2001: 195-198
9. Kraezlin ME: Biochemical Markers of bone Turnover and Osteoporosis management. IBMS BoneKey 2007; 4: 191-203, 204-205. Dostopno na: <http://www.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;4/7/191>
10. Philip DR: Osteoporoza. Pogostost, posledice in dejavniki tveganja. Dostopno na: <http://jama-slo.prahacom.com/jama97-2/html/osteopo.html>
11. Kocijančič A: Smernice za odkrivanje in zdravljenje osteoporoze. Zdravstveni vestnik 2002; 71: 571-573
12. Paradowska A, Lacki JK: Genetic aspect of osteoporosis. Centr Eur J Immunol 2007; 32(3):172-180
13. Peacock M, Turne CHr, Econs MJ, Foroud T: Genetics of Osteoporosis. Endocrine Review 2002; 23(3): 303-326
14. Ralston SH: Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(6): 2460-2466
15. Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y: Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in

postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Mineral Res* 1999, Volume 14; 4(11): 518-527

16. Hofbauer LC: Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 195-210

17. Mencej Bedrač S, Marc J: Sistem RANKL/RANK/OPG – nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 175-178

18. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79: 243-253

19. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL: The Roles of osteoprotegerin and OPG Ligand in the paracrine Regulation of Bone Resorption. *JBMR* 2000; 15: 2-12

20. Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, Komayashi F, Tsui E, Maringa T, Higashio K: Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998; 273(9): 5117-5123

21. Marinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K: Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998; 254: 685-691

22. Arko B, Preželj J, Komel R, Kocijančič A, Hudler P, Marc J: Sequence Variations in the Osteoprotegerin Gene Promoter in Patients with Postmenopausal Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2): 4080-4084

23. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF: Polymorphisms in the Osteoprotegerin Gene are Associated with Osteoporotic Fractures. *JBMR* 2002; 17(7): 1245-1255

24. Khosla S: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5050-5055

25. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, Ružička V, Oral I, Horalik D: Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers* 2001; 145(2): 61-64

26. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: Chapter 8: 8.1-8.24

27. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL: Genetic applications of an inverse Polymerase chain reaction. *Genetics* 1988; 120: 621-623

28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning, 2nd Ed., A laboratory manual*, 1989: 6.19-6.3

29. Arko B, Preželj J, Kocijančič A, Komel R, Marc J: Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 51: 270-279
30. Coleman WB, Tsongalis GJ: *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboration*. Human Press 1997
31. Mueller RF, Young ID: *Emery's Elements of Medica Genetics*, 10th Ed., Churchill Livingstone, 1998: 113-120
32. Cremers S, Gornero P: Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease; potential uses and pitfalls. *Drugs* 2006; 66(16): 2031-58
33. Ganero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD: Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1693-700
34. Ciritelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N: Bone turnover markers: understanding their value in clinical trails and practice. *Osteoporos Int* 2009. Epub ahead of print
35. Garnero P: Advances in bone turnover assessment with biochemical markers. *Medicographia* 2008; 30(4):339-49
36. Biomedica Gruppe: <http://www.bmgrp.com/>
37. NCBI, Single Nucleotide Polymorphism database: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3134069](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3134069)
38. Garcia-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, Sanudo C, Berja A, Valero C, Pesquera C, Paule B, Gonzalez-Macias J, Amado JA: Association of the 163A/G and 1181G/C Osteoprotegerin Polymorphism with Bone Mineral Density. *Horm Metab Res*, 2008; 40: 219-224
39. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM: Association between osteoprotegerin (OPG) receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) ligand gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007; 15(5):913-8
40. Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, Daly M, Shanahan F, Molloy MG, Quane KA: Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 Polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int*. 2002; 71(1): 26-35

41. Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, Komel R, Marc J: Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas* 2005; 51(3):270-9
42. Zhao HY, Liu JM, Ning G, Zhao YJ, Zhang LZ, Sun LH, Xu MY, Utterlinden AG, Chen JL: The influence of Lys3Asp polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2005; 16(12):1519-1524
43. Ueland T, Bollerslev J., Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Mullin BH, Devine A, Prince RL: No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measurements of osteoporosis in early Australian women. *Bone* 2007; 40(1): 175-81
44. Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Chin CS, Kim H, Lee KM, Lee KH, Kang C, Cho DY, Kang D: Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(3): 152-9
45. Vidal C, Brincat M, Xuereb Anastasi A: TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Maturitas* 2002; 53(4):386-95
46. Yamada Y, Anodo F, Niino N, Shimokata H: Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Dostopno na: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WNG-494S5NG-3&\\_user=10&\\_rdoc1&\\_fmt=&\\_orig=search](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WNG-494S5NG-3&_user=10&_rdoc1&_fmt=&_orig=search)*
47. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K.: Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008; 358(22):2355-65
48. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD: Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008; 371(9623):1505-12.
49. Žorž G: Prevalenca osteoporoze v Sloveniji. *ISIS* 2006; XV(3): 34-37

## PRILOGA 1

Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip
666	TT	716	TT	766	TG	816	TT	950	TT
667	TT	717	TG	767	TG	817	TT	951	TT
668	TT	718	TT	768	TT	818	TT	952	TT
669	TT	719	TT	769	TT	819	TT	953	TT
670	TT	720	TT	770	TT	820	TT	954	TT
671	TT	721	TT	771	TT	821	TT	955	TT
672	TT	722	TT	772	TT	822	TT	956	TT
673	TT	723	TT	773	TG	823	TT	957	TT
674	TT	724	TT	774	TT	824	TT	958	TG
675	TT	725	TT	775	TT	825	TG	959	TT
676	TT	726	TG	776	TT	826	TT	960	TT
677	TT	728	TT	777	TG	827	TT	961	TT
678	TT	729	TT	778	TT	913	TG	962	TT
679	TT	730	TT	779	TT	914	TT	963	TT
680	TT	731	TT	780	TT	915	TT	964	TT
681	TT	732	TT	781	TT	916	TT	965	TT
682	TT	733	TT	782	TT	917	TT	966	TT
683	TT	734	TT	783	TT	918	TT	967	TT
684	TT	735	TT	784	TT	919	TT	968	TT
685	TT	736	TT	785	TT	920	TT	969	GG
686	TT	737	TT	786	TT	921	TT	970	TT
687	TG	738	TT	787	TG	922	TT	971	TT
688	TT	739	TT	789	TT	923	TT	972	TT
689	TG	740	TT	790	TG	924	TT	973	TT
690	TT	741	TT	791	TT	925	TT	974	TT
691	TT	742	TT	792	TT	926	TG	975	TT
692	TT	743	TG	793	TT	927	TT	976	TG
693	TT	744	TT	794	TT	928	TT	977	TG
694	TT	745	TT	795	TT	929	TT	978	TT
695	TG	746	TT	796	TT	930	GG	979	TG
696	TT	747	TT	797	TT	931	TT	980	TT
697	TT	748	TT	798	TT	932	TG	981	TT
698	TG	749	TT	799	TT	933	TT	982	TT
699	TT	750	TT	800	TT	934	TT	983	TG
700	TT	751	TT	801	TT	935	TG	984	TT
701	TT	752	TT	802	TT	936	TT	985	TT
702	TT	753	TT	803	TT	937	TT	986	TT
703	TT	754	TT	804	TT	938	TT	987	TT
704	TG	755	TT	805	TT	939	TT	988	TT
705	TT	756	TT	806	TT	940	TT	989	TT
706	TT	757	TT	807	TT	941	TT	990	TT
708	TT	758	TT	808	TT	942	TT	991	TT
709	TT	759	TT	809	TT	943	TT	992	TT
710	TT	760	TT	810	TT	944	TG	993	TT
711	TT	761	TT	811	TT	945	TT	994	TG
712	TT	762	TT	812	TT	946	TT	995	TT
713	TT	763	TT	813	TG	947	TT	996	TT
714	TT	764	TT	814	TT	948	TT	997	TT
715	TG	765	TG	815	TT	949	TT	998	TT

Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip
1000	TT	1054	TT	1108	TT	46opg	TT	103opg	TT
1001	TT	1055	TT	1109	TG	47opg	TT	104opg	TT
1002	TT	1056	TT	1110	TT	48opg	TT	105opg	TT
1003	TT	1057	TT	1111	TG	49opg	TT	106opg	TT
1004	TT	1058	TT	1112	TT	50opg	TG	107opg	TT
1005	TT	1059	TT	1113	TT	51opg	TG	108opg	TT
1006	TT	1060	TT	1114	TT	52opg	TT	109opg	TT
1007	TG	1061	TT	1115	TT	53opg	TG	110opg	TT
1008	TT	1062	TT	1116	TT	54opg	TT	111opg	TT
1009	TT	1063	TT	1117	TT	55opg	TT	112opg	TT
1010	TT	1064	TT	1118	TT	56opg	TT	113opg	TT
1011	TT	1065	TT	1119	TT	57opg	TT	114opg	TT
1012	TT	1066	TT	1120	TT	58opg	TT	115opg	TT
1013	TT	1067	TT	1121	TT	59opg	TT	116opg	TT
1014	TT	1068	TT	1122	TT	60opg	TT	117opg	TT
1015	TT	1069	TT	1123	TT	61opg	TT	587r	TG
1016	TT	1070	TT	1124	TG	62opg	TT	588r	TG
1017	TG	1071	TT	1125	TG	63opg	TT	589r	TT
1018	TT	1072	TT	1126	TT	64opg	TT	591r	TT
1019	TT	1073	TG	102opg	TT	65opg	TT	592r	TT
1020	TT	1074	TG	11opg	TG	67opg	TT	593r	TT
1021	TT	1075	TT	12opg	TT	68opg	TT	594r	TT
1022	TT	1076	TT	13opg	TT	69opg	TT	595r	TT
1023	TT	1077	TT	14opg	TT	70opg	TT	596r	TT
1024	TT	1078	TT	15opg	TT	71opg	TT	597r	TT
1025	TG	1079	TT	16opg	TT	72opg	TT	598r	TT
1026	TT	1080	TT	17opg	TG	73opg	TT	599r	TT
1027	TT	1081	TT	18opg	TT	74opg	TT	600r	TT
1028	TT	1082	TG	19opg	TT	75opg	TT	601r	TT
1029	TT	1083	TT	20opg	TT	76opg	TT	602r	TT
1030	TT	1084	TT	21opg	TT	77opg	TT	603r	TT
1031	TT	1085	TT	22opg	TT	78opg	TG	604r	TT
1032	TT	1086	TT	24opg	TT	79opg	TT	605r	TT
1033	TT	1087	TT	25opg	TT	80opg	TT	607r	TG
1034	TT	1088	TT	26opg	TT	81opg	TT	608r	TT
1035	TT	1089	TT	27opg	TT	83opg	TT	609r	TT
1036	TT	1090	TT	28opg	TT	84opg	TT	610r	TT
1037	TT	1091	TT	29opg	TG	85opg	TG	611r	TT
1038	TT	1092	TT	30opg	TT	86opg	TT	612r	TT
1039	TT	1093	TT	31opg	TT	87opg	TT	613r	TT
1040	TT	1094	TT	32opg	TT	88opg	TT	614r	TT
1041	TT	1095	TT	33opg	TT	89opg	TT	615r	TT
1042	TT	1096	TT	34opg	TG	90opg	TT	616r	TT
1043	TT	1097	TT	35opg	TG	91opg	TT	617r	TT
1044	TT	1098	TT	36opg	TT	92opg	TT	618r	TT
1045	TT	1099	TT	37opg	TT	93opg	TT	619r	TG
1046	TT	1100	TT	38opg	TG	94opg	TT	620r	TT
1047	TT	1101	TT	39opg	TT	95opg	TT	621r	TT
1048	TT	1102	TG	40opg	TT	96opg	TT	622r	TT
1049	TT	1103	TT	41opg	TT	97opg	TT	623r	TT
1050	TT	1104	TT	42opg	TT	98opg	TT	624r	TT
1051	TT	1105	TT	43opg	TT	99opg	TT	625r	TT
1052	TT	1106	TT	44opg	TG	100opg	TT	626r	TG
1053	TT	1107	TT	45opg	TT	101opg	TT	627r	TT
1105Z	TT	1106Z	TG	1107Z	TG	1108Z	TG	1110Z	TT

Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip	Zaporedna št.	genotip
628r	TT	1127	TT	121f	TT	97f	TT	1068Z	TT
629r	TT	1128	TT	122f	TT	98f	TT	1069Z	TG
630r	TG	1129	TG	123f	TT	99f	TT	1070Z	TG
631r	TT	1130	TT	124f	TG	10pg	TT	1071Z	TT
632r	TT	1131	TT	125f	TT	20pg	TT	1072Z	TT
633r	TT	1132	TT	126f	TT	30pg	TT	1074Z	TT
634r	TT	1133	TT	129f	TT	40pg	TT	1075Z	TT
635r	TT	1134	TG	130f	TG	50pg	TT	1076Z	TT
636r	TT	1135	TT	131f	TT	60pg	TT	1077Z	TT
637r	TT	1136	TT	134f	TT	70pg	TT	1078Z	TT
638r	TG	1137	TT	135f	TG	80pg	TT	1079Z	TT
639r	TT	1138	TT	136f	TT	90pg	TT	1081Z	TT
640r	TT	1139	TT	137f	TT	100pg	TT	1082Z	TT
659r	TT	1140	TG	138f	TT	1035Z	TT	1083Z	TT
660r	TT	1141	TT	139f	TT	1036Z	TT	1085Z	TT
661r	TT	1143	TT	140f	TT	1037Z	TG	1087Z	TT
662r	TG	1144	TT	141f	TT	1038Z	TT	1088Z	TT
663r	TT	1145	TG	142f	TT	1039Z	TT	1089Z	TG
664r	TT	1146	TG	146f	TT	1040Z	TT	1090Z	TT
665r	TT	1147	TT	148f	TT	1041Z	TG	1091Z	TT
666r	TT	1148	TT	149f	TT	1042Z	TT	1092Z	TT
667r	TT	1149	TT	155f	TT	1043Z	TT	1093Z	TT
1002Z	TT	1150	TT	156f	TT	1045Z	TT	1094Z	TG
1003Z	TT	100f	TT	158f	TT	1049Z	TT	1095Z	TT
1004Z	TT	101f	TT	159f	TT	1051Z	TT	1097Z	TG
1005Z	TT	102f	TT	160f	TT	1052Z	TG	1098Z	TT
1006Z	TT	103f	TT	161f	TT	1053Z	TT	1100Z	TT
1007Z	TT	106f	TG	163f	TG	1054Z	TG	1101Z	TT
1008Z	TT	108f	TT	167f	TG	1055Z	TT	1102Z	TT
1009Z	TT	109f	TT	168f	TT	1056Z	TT	1103Z	TT
1010Z	TT	110f	TT	169f	TT	1057Z	TT	1104Z	TG
1011Z	TT	111f	TT	170f	TT	1058Z	TT		
1012Z	TT	112f	TT	171f	TT	1059Z	TT		
1021Z	TT	113f	TT	174f	TG	1060Z	TT		
1028Z	TT	114f	TT	175f	TT	1061Z	TT		
1030Z	TG	115f	TT	176f	TT	1062Z	TT		
1031Z	TG	117f	TT	93f	TT	1064Z	TT		
1032Z	TT	118f	TT	94f	TT	1065Z	TT		
1033Z	TT	119f	TT	95f	TT	1066Z	TG		
1034Z	TT	120f	TT	96f	TT	1067Z	TT		